

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDIONE FATIMA CANZI

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DO SUCO DE LIMÃO TAHITI
(*Citrus latifolia*) NO CONTROLE DO FLUXO MENSTRUAL

CURITIBA

2018

EDIONE FATIMA CANZI

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DO SUCO DE LIMÃO TAHITI
(*Citrus latifolia*) NO CONTROLE DO FLUXO MENSTRUAL

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Prof^a Dr^a Beatriz Helena L. N. Sales
Maia.

CURITIBA
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

C235a

Canzi, Edione F.

Avaliação do potencial biológico do suco de limão tahiti (*Citrus latifolia*) no controle do fluxo menstrual / Edione F. Canzi. – Curitiba, 2018.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Helena L. N. S. Maia.

1. Fluxo menstrual. 2. Desordens menstruais. 3. Prostaglandinas. 4. *Citrus latifolia*.
I. Universidade Federal do Paraná. II. Maia, Beatriz Helena L. N. S. III. Título.

CDD: 543

Bibliotecária: Romilda Santos - CRB-9/1214

TERMO DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DO SUCO DE LIMÃO
TAHITI (*CITRUS LATIFOLIA*) NO CONTROLE DO FLUXO
MENSTRUAL**

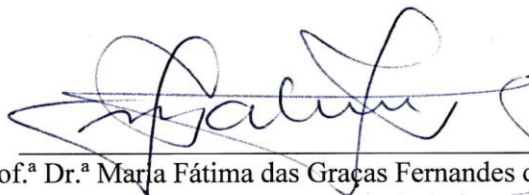
por

EDIONE FÁTIMA CANZI

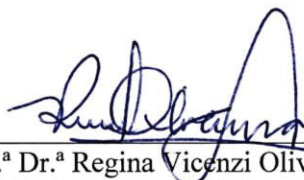
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



Prof.^a Dr.^a Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia
Orientador
Dep. de Química – UFPR



Prof.^a Dr.^a Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva
Dep. de Química – UFSCar



Prof.^a Dr.^a Regina Vicenzi Oliveira
Dep. de Química – UFSCar



Prof.^a Dr.^a Ana Luísa Lacava Lordello
Dep. de Química – UFPR



Prof.^a Dr.^a Andrea Pinto de Oliveira
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 24 de abril de 2018.

Aqueles que eu amo!

AGRADECIMENTOS

Demonstro minha gratidão, primeiramente, à Deus, pela oportunidade de existir e a quem tem me ensinado a Conhecê-lo:

"Não se conforme somente com saber que Deus existe. Você deve senti-Lo através das manifestações conscientes de seu próprio espírito; isto lhe será possível à medida que consiga penetrar nos conhecimentos que conduzem a Ele."

Raumsol

Minha eterna gratidão, às minhas "irmãzinhas", Amanda e Julia, pelo amor de sempre.

A meus irmãos, Adenize e Juceli, pela compreensão e paciência, devido à minha ausência.

Aos todos os seres que constituem minha família, àqueles que a vida foi colocando em meu caminho aos poucos:

Aos meus pais, Nilse e Valdir, que com sua ausência me ensinaram a ser valente desde cedo;

Ao meu pai de criação, Cesar Reiter, pela oportunidade de uma nova família;

Ao meu marido, Luís Antonio, por me ensinar amar e ser amada, e pela oportunidade de fazer parte de sua amável família.

Aos amigos, que me apoiaram e confiaram em minha capacidade, mesmo quando eu mesma já tinha desistido.

Agradeço à minha orientadora Professora Dra. Beatriz H. L. de Noronha S. Maia, pela dedicação e apoio, pela confiança, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade.

Agradeço às profas Dra Maria Fátima G. Fernandes e Quezia B. Cass por ceder toda estrutura e condições para a realização desse trabalho, pela paciência e crédito.

À profa Dra Regina de Oliveira pela colaboração e amizade.

À profa Dra Daniela Chagas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Alfenas – MG, pela colaboração.

E à Dra Bianca Rebelo pela amizade, colaboração nesse trabalho e conhecimentos transmitidos.

Agradeço aos amigos e colegas dos laboratórios: PN-UFSCar; Separare-UFSCar; LAPNEQ-UFPR, por tornarem esses anos de convivência mais leves e divertidos... e por terem sido como uma família durante todo o tempo que passamos juntos.

My gratitude to Dr. Robert Moritz for the internship opportunity and the amazing experience I had at Institute for Systems Biology (Seattle, USA). In addition, for all the "ISBers": I have no words to say thank you for the amazing time we spent together.

Agradeço a todos os professores que fizeram parte dessa etapa e me proporcionaram conhecimentos para cumpri-la com êxito.

À CAPES pela bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR e UFSCar.

Sou grata a todos que colaboraram de alguma forma na minha vida durante o período de doutoramento.

" Recordo que uma vez alguém perguntou a um sábio se a humanidade submergiria na ignorância, supondo que algum dia todos os livros que existem no mundo fossem destruídos. E o sábio respondeu: 'Duas coisas são necessárias para reconstruir imediatamente todos os livros que existem caso tivessem sido destruídos: a Natureza, que é o maior livro que existe no Universo, e uma mente que perceba e possa transmitir aos demais as imagens que capte dela. As páginas desse gigantesco livro são os dias e as noites, que cada homem vira sem cessar, enquanto dura sua existência'."

Carlos Bernardo Gonzalez Pecote

RESUMO

A menstruação é caracterizada como um processo inflamatório, o qual é iniciado pela queda dos níveis de progesterona e estrógeno, juntamente com o processo de regressão do corpo lúteo, levando a síntese de mediadores pró-inflamatórios, como as prostaglandinas (PGs), sendo $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 encontradas em grandes quantidades no sangue menstrual, atuando na vasoconstrição e vasodilatação do músculo liso e vasos sanguíneos. Desordens menstruais como a menorrágia têm sido associada a irregularidades nos níveis dessas PGs. Estudos preliminares em nosso grupo de estudo mostram que o suco de limão Tahiti (*Citrus latifolia*) reduz o sangramento menstrual. Frutos de citros são ricos em flavonoides, os quais são potentes anti-inflamatórios naturais, levantando a hipótese de que o mecanismo de regulação do sangramento excessivo pode ser controlado pela ação desses. Diante disso, este trabalho teve como objetivos: Desenvolvimento de um método por SPE-LC-MS/MS para quantificação dos níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 em fluido menstrual de dois grupos de amostra: controle (sem tratamento) e tratamento (suplementação com suco de limão Tahiti). As PGs foram capturadas em cartucho OASIS HLB por 3 minutos para limpeza e enriquecimento, e então transferidas durante apenas 42 segundos para uma coluna analítica HSS T3 C18, para separação. As prostaglandinas (PGs) foram detectadas pelo modo SRM negativo, PGE_2 (m/z 351 \rightarrow 315) e $\text{PGF}_{2\alpha}$ (m/z 353 \rightarrow 193) usando padrão interno marcado isotopicamente (PGE_2 -d4, m/z 355 \rightarrow 319). A faixa de linearidade foi de 10,34 - 1,034 ng e o limite inferior de quantificação (LLOQ) foi de 10,34 ng para ambas as PGs. Parâmetros de validação foram avaliados com sucesso de acordo com as normativas da European Medicines Agency (EMA). O método não apresentou efeito matriz e a eficiência de processo foi em torno de 100%; com apenas 15 minutos de tempo de análise, possibilitando baixo consumo de solvente. Como segundo objetivo foi realizada a caracterização química dos compostos do suco de limão Tahiti e sua atividade de inibição *in vitro* frente às enzimas ciclo-oxigenases. Para o suco de limão foram identificados por LC-MS/MS (QqTOF) nove flavonoides O/C-glicosilados: 3 flavanonas (eriocitrina, hesperidina e naringina), 1 flavonol (rutina) e 5 flavonas (diosmina, luteolina 7-O-rutinese, vitexin 2"-O-rhamnoside e vicianina-2); por abordagens de comparação com padrão e desreplicação. O suco de limão mostrou forte inibição frente às enzimas COX-1 e COX-2.

Palavras-chave: Desordens menstruais. Prostaglandinas. Suco de limão Tahiti. *Citrus latifolia*. Flavonoides glicosilados. Ciclo-oxigenases 1 e 2. SPE-LC-MS/MS. SRM. LC-MS/MS. Desreplicação.

ABSTRACT

Menstruation is characterized as an inflammatory process, which is triggered by the drop in progesterone and estrogen levels, along with corpus luteum regression, leading to pro-inflammatory mediator synthesis, such as prostaglandins (PGs). $\text{PGF}_{2\alpha}$ and PGE_2 are found in large quantities in the menstrual blood and act on vasoconstriction and vasodilation of smooth muscle and blood vessels. Menstrual disorders such as menorrhagia have been associated with irregularities in $\text{PGF}_{2\alpha}$ and PGE_2 levels. Preliminary studies in our research group show that Tahiti lemon juice (*Citrus latifolia*) reduces the menstrual bleeding. Citrus fruits are rich in flavonoids, which are potent natural anti-inflammatories, raising the hypothesis that the regulation of excessive bleeding mechanism could be controlled by their action. For this, the objectives of this work was: to develop a method by SPE-LC-MS/MS to quantify the $\text{PGF}_{2\alpha}$ and PGE_2 levels in menstrual fluid of two sample groups: control (without treatment) and treatment (supplementation with Tahiti lemon juice). The PGs were trapped on an OASIS HLB cartridge for 3 minutes for cleanup and enrichment, and then transferred during only 42 seconds to a HSS T3 C18 analytical column, for separation. Prostaglandins (PGs) were detected by SRM negative mode, PGE_2 (m/z 351 \rightarrow 315) and $\text{PGF}_{2\alpha}$ (m/z 353 \rightarrow 193) using isotope-labeled internal standard ($\text{PGE}_2\text{-d}_4$, m/z 355 \rightarrow 319). The concentration linear range was of 10.34 – 1.034 ng and the lower limit of quantification (LLOQ) was 10.34 ng for both PGs. Validation parameters were successfully assessed according to European Medicines Agency guideline (EMA). The method showed no matrix effect and process efficiency around 100%, in addition to only 15 minutes of analysis time with lower solvent consumption. The second objective was the chemical characterization of Tahiti lemon juice compounds, as well as their *in vitro* inhibition activity against cyclooxygenases enzymes (COX). Lemon juice was analyzed by LC-MS/MS (QqTOF), and nine O/C-glycosylated flavonoids were identified: 3 flavanones (eriocitrin, hesperidin and naringin), 1 flavonol (rutin) and 5 flavones (diosmin, luteolin 7-O-rutinoside, vitexin 2"-O-rhamnoside and vicenin-2); by standard and dereplication approaches. The lemon juice also demonstrated strong inhibition of both COX-1 and COX-2 enzymes.

Keywords: Menstrual disorders. Prostaglandins. Tahiti lemon juice. *Citrus latifolia*. Glycosylated flavonoids. Cyclooxygenases 1 and 2. SPE-LC-MS/MS. SRM. LC-MS/MS. Dereplication.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo menstrual descrito do ponto de vista do ciclo hormonal e endometrial. Adaptado de GUYTON e HALL, 2006.	22
Figura 2. Procedimento de SPE off-line (acima). Procedimento de SPE on-line (abaixo). Etapas: 1. Ativação. 2. Condicionamento. 3. Carregamento da amostra. 4. Limpeza do interferentes. 5. Eluição da fração de interesse. 6. Evaporação. 7. Reconstituição e 8. Injeção. Adaptado de Boonjob, 2014.	28
Figura 3. Mecanismo de Ionização por ElectroSpray (ESI). Fonte: SIMOES, 2013. .	31
Figura 4. Analisador triplo quadrupolo (QqQ). Adaptado de (BOJA. RODRIGUEZ, 2011).	32
Figura 5. Experimento de monitoramento de reação selecionada (SRM) em analisador de massas triplo quadrupolo. Adaptado de SIMOES, 2013.	32
Figura 6. A queda dos hormônios progesterona e estradiol, juntamente com a morte celular, ativa a enzima fosfolipase-2 (PLA-2) que atua na ruptura da membrana fosfolipídica da membrana celular, liberando o ácido araquidônico (AA), o qual é precursor dos eicosanoides. Pela ação da COX-2 o AA é metabolizado em diferentes prostaglandinas, como é o caso da PGF2 α e PGE2. Fonte: autor.....	33
Figura 7. Sequência de eventos para o sistema on-line SPE-LC-MS/MS.....	48
Figura 8. Esquema representativo dos três conjuntos (A, B e C) das amostras para calcular EM, RE e EE. Adaptado de TRUFELLI et al., 2010.	50
Figura 9. Curva de calibração preparada em soro periférico para PGE2 e PGF2 α . Faixa de concentração de 10,3 – 1.035 ng mL ⁻¹	54
Figura 10. Gráfico da concentração média de PGE2 e PGF2 α para os grupos controle e tratado. Barra de erro em porcentagem. *PGE2 p-valor (P>0.05) e **PGF2 α (P<0.05) significativa.	57
Figura 11. Principais flavonoides glicosilados encontrados em suco de Citrus.....	61
Figura 12. Representação da distribuição das principais classes de metabólitos secundários encontrados em Citrus. Fonte: autor.....	64
Figura 13. Fruto de limão Tahiti (Citrus latifolia).	67
Figura 14. Flavonoides identificados no suco de Citrus latifolia. Fonte: adaptado de Nogata et al., 2006.	67
Figura 15. Biossíntese das principais classes de flavonoides encontrados no gênero Citrus. CHS: chalcona sintase. CHI: chalcona isomerase. FSI: flavona sintase. FHT: flavanona 3-hidroxilase. FLS: flavonol sintase. DFR: dihidroflavonol 4-redutase. Adaptado de Dewick, 2002 e Khan et al., 2014.....	70
Figura 16. Reações de formação de A) O-glicosilação e B) C-glicosilação. Adaptado de Dewick, 2002.	71
Figura 17. Estruturas sobrepostas de COX-1 (vermelha) e COX-2 (azul), mostrando a principal diferença na posição 523 (ampliação à direita) pela presença de isoleucina em COX-1 e valina em COX-2. Adaptado de Simmons et al., 2004.	74

Figura 18. Etapa catalítica na reação de ciclo-oxigenação do AA, na presença do radical tirosila e oxigênio molecular. Fonte: Simmons et al., 2004.	75
Figura 19. Representação do mecanismo de inibição da COX-1 pela aspirina (em azul). Mesmos sítios de ligação do ácido araquidônico e AINEs. Adaptado de Simmons et al., 2004.....	76
Figura 20. Abaixo: espectro de RMN 1H do suco de limão Tahiti puro em CD3OD (400 MHz). Acima: região do espectro expandida de 1,0 a 4,5 ppm.	84
Figura 21. Região ampliada dos cromatogramas sorbepostos. Azul: suco de limão Tahiti. Verde: suco fortificado com os padrões (50 µg mL ⁻¹).	88
Figura 22. Rutinose e neohesperidose, isômeros constitucionais de posição, são O-diglicosídeos bastante comuns em Citrus. Fonte: Autor.	90
Figura 23. Notação para fragmentação de flavonoides glicosilados, representação em kaempferol-7-O-rutinosídeo. Adaptado de Ferreres et al., 2004.	91
Figura 24. Fragmentação de agliconas, representado para flavona.	92
Figura 25. Cromatograma com os compostos identificados e inferidos para o suco de limão Tahiti por LC-MS/MS, modo ESI ⁻	96
Figura 26. Estrutura química de hesperitina-7-O-rutinosídeo (esquerda) e quercetina-3-O-rutinosídeo (direita).	98
Figura 27. Espectro de ESI ⁻ e ampliação (38 eV) de rutina m/z 609,1443.....	99
Figura 28. Proposta de mecanismo de fragmentação para rutina, ESI ⁻	99
Figura 29. Espectros de ESI ⁻ (38eV, acima, referente aos padrões) e ESI ⁻ (60eV, abaixo, referente a desreplicação) de hesperidina m/z 609,1809.	100
Figura 30. Proposta de mecanismo de fragmentação para hesperidina, ESI ⁻	101
Figura 31. Espectro de ESI ⁻ (acima) e ESI ⁺ (abaixo) (37eV) de eriocitrina m/z 595,1618 e 597,1845, respectivamente.	102
Figura 32. Proposta de mecanismo de fragmentação para eriocitrina, ESI ⁻	102
Figura 33. Naringina neohesperidose (1→2) (esquerda) e narirutina rutinosídeo (1→6) (direita).	103
Figura 34. Espectro de ESI ⁻ (37eV) de naringina m/z 579,1705.	104
Figura 35. Proposta de fragmentação para naringina, neohesperidose (1→2), modo ESI ⁻	104
Figura 36. Espectro de ESI ⁻ (37eV) de narirutina m/z 579,0605.	105
Figura 37. Proposta de fragmentação para narirutina, rutinosídeo (1→6), modo ESI ⁻	106
Figura 38. Estruturas das possíveis flavonas O-7-glucosídeo, encontradas em Citrus, para m/z 608,1736 Da.....	107
Figura 39. Espectros de ESI ⁻ com 37eV (acima) e 60eV (abaixo) para flavona O-7-glucosídeo m/z 607,1751.	109
Figura 40. Proposta de fragmentação para m/z 607,1751, modo ESI ⁻	110

Figura 41. Estruturas de flavonas propostas para m/z 578,1630 Da, encontrados em suco de Citrus.	111
Figura 42. Espectro de ESI ⁻ (57eV) para flavona O-7-glucosídeo m/z 577,1508... 111	111
Figura 43. Proposta de fragmentação para O-flavona m/z 577,1608, modo ESI ⁻ ... 112	112
Figura 44. Fragmentações características de flavonoide C-glicosilado, indicando o número das ligações clivadas e perda neutra. Fonte: autor..... 112	112
Figura 45. Espectro de ESI ⁻ (24eV) para flavona O-7-diglucosídeo m/z 577,1552. 113	113
Figura 46. Proposta de fragmentação para C-flavona m/z 577,1552, modo ESI ⁻ ... 113	113
Figura 47. Estruturas de flavonas propostas para m/z 594,1585 Da (C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅), encontrados em suco de Citrus..... 115	115
Figura 48. Espectro de ESI ⁻ (59eV) para luteolina 7-O-rutinese m/z 593,1494..... 116	116
Figura 49. Proposta de fragmentação para luteolina 7-O-rutinese m/z 593,1494, modo ESI ⁻ 116	116
Figura 50. Espectro de ESI ⁻ (43eV) para vicenina-2 m/z 593,1494..... 117	117
Figura 51. Proposta de fragmentação para vicenina-2 m/z 593,1494, modo ESI ⁻ . . 118	118
Figura 52. Gráficos de porcentagem de inibição do suco de limão Tahiti para COX-1 (acima) e COX-2 (abaixo)..... 121	121
Figura 53. Espectro de massas (90 eV) (ESI ⁺) extraído entre 6 e 7 minutos, região de eluição das PGs e fragmento característico m/z 184 monitorado para fosfolipídeos. 143	143
Figura 54. Cromatogramas de íons totais obtidos para o soro branco (abaixo) e soro fortificado as prostaglandinas (acima)..... 144	144
Figura 55. Gráfico de dispersão dos resíduos em função de X para PGF ₂ α. 145	145
Figura 56. Gráfico de dispersão dos resíduos em função de X para PGE ₂ 145	145
Figura 57. Espectros de massas (LC-QqToF) do suco de limão Tahiti. Acima: modo negativo (ESI ⁻), abaixo: modo positivo (ESI ⁺)..... 146	146
Figura 58. Espectro de ESI ⁺ (45 eV) para rutina (tr = 20 min) m/z 611,1625. 147	147
Figura 59. Espectro de ESI ⁻ (60 eV) para rutina (tr = 20 min) m/z 609,1503..... 147	147
Figura 60. Espectro de ESI ⁺ (45 eV) para hesperidina (tr = 24 min) m/z 611,1975. 148	148
Figura 61. Espectro de ESI ⁻ (60 eV) para hesperidina (tr = 24 min) m/z 609,1899. 148	148
Figura 62. Espectro de ESI ⁺ (27 eV) para eriocitrina (tr = 19,6 min) m/z 597,1830. 149	149
Figura 63. Espectro de ESI ⁻ (60 eV) para eriocitrina (tr = 19,5 min) m/z 595,1708. 149	149
Figura 64. Espectro de ESI ⁺ (41 eV) para naringina (tr = 22,1 min) m/z 581,1866. 150	150
Figura 65. Espectro de ESI ⁻ (58 eV) para naringina (tr = 19,5 min) m/z 579,1767.150	150

Figura 66. Espectro de ESI+ (45 eV) para diosmina/neodiosmina (tr = 23,4 min) m/z 609,1846.	151
Figura 67. Proposta de fragmentação para m/z 609,1819, modo ESI+.....	151
Figura 68. Espectro de ESI+ (24 eV) para apigenin-7-O-rutinoside ou neohesperidose (tr = 24,3 min) m/z 579,1760.	152
Figura 69. Espectro de ESI- (58 eV) para apigenin-7-O-rutinoside ou neohesperidose (tr = 24,3 min) m/z 577,1608.	152
Figura 70. Espectro de ESI+ (37 eV) para vitexin 2"-O-rhamnoside (tr = 22,7 min) m/z 579,1717.	153
Figura 71. Espectro de ESI- (24 eV) para vitexin 2"-O-rhamnoside (tr = 22,5 min) m/z 579,1665.	153
Figura 72. Espectro de ESI+ (35 eV) para vitexin 2"-O-rhamnoside (tr = 15,8 min) m/z 595,1667.	154
Figura 73. Espectro de ESI- (59 eV) para vitexin 2"-O-rhamnoside (tr = 15,9 min) m/z 593,1562.	154
Figura 74. Espectro de ESI+ (43 eV) para luteolina 7-O-rutinoside ou neohesperidose (tr = 20,6 min) m/z 595,1673.	155
Figura 75. Espectro de ESI+ (27 eV) para luteolina 7-O-rutinoside ou neohesperidose (tr = 20,6 min) m/z 595,1671.	155
Figura 76. Espectro de ESI- (35eV) do padrão quercetina (tr = 22,5 min) m/z 301,0273.	156
Figura 77. Espectro de ESI+ (35eV) do padrão quercetina m/z 303,0508.	157
Figura 78. Proposta de fragmentação para quercetina, modo ESI-.....	157
Figura 79. Espectro de ESI- (acima) (35eV) do padrão naringenina m/z 271,0691.	158
Figura 80. Espectro de ESI+ do padrão naringenina 273,0763.....	158
Figura 81. Proposta de fragmentação para naringenina, modo ESI-.	159
Figura 82. Espectro de ESI- (35 eV) do padrão de ácido cafeico m/z 179,0276. ...	160
Figura 83. Proposta de fragmentação para o ácido cafeico, modo ESI-.	160
Figura 84. Espectro de ESI- (20eV) do padrão de ácido gálico m/z 169,0071.	161
Figura 85. Proposta de fragmentação para o ácido gálico, modo ESI-.	161

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Prostaglandinas avaliadas em matrizes biológicas.	36
Tabela 2. Condições otimizadas para ionização e fragmentação das PGs.	44
Tabela 3. Método otimizado para procedimento de SPE <i>on-line</i> , coluna OASIS HLB.	47
Tabela 4. Efeito de Matriz (EM), Recuperação (RE) e Eficiência de Extração (EE) para etapa de diluição da amostra.	51
Tabela 5. Estabilidade para PGs. CQB: 31,03 ng mL ⁻¹ e CQA: 931,0 ng mL ⁻¹	53
Tabela 6. Linearidade, limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), valores de teste de Cochran's.	54
Tabela 7. Exatidão, precisão intra- e inter-lote, efeito de matriz (EM) e eficiência de processo (EP) para CQB: 31,03. CQM: 517,2 e CQA: 931,0 (ng mL ⁻¹).	56
Tabela 8. Substâncias catalogadas para o gênero <i>Citrus</i> (Cerqueira, 2016).	63
Tabela 9. Flavonoides presentes em frutos de <i>C. latifolia</i> (mg/100g de peso fresco).	67
Tabela 10. Quantidades de metabólitos detectados em 400 mL de uma mistura de suco de <i>C. sinensis</i> (laranja) e <i>C. limon</i> (limão).	84
Tabela 11. Condições otimizadas para método cromatográfico para análise da fração orgânica de suco limão Tahiti.	87
Tabela 12. Flavonoides identificados no suco de limão Tahiti (<i>Citrus latifolia</i>), analisado por LC-ESI-Qq-TOF.	94
Tabela 13. Preparo de soluções para ensaio enzimático.	119
Tabela 14. Valores de IC ₅₀ para inibição de COX-1 e 2.	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - ácido araquidônico
ACN - Acetonitrila
AcOEt - Acetato de etila
AINE - anti-inflamatório não-esteroidal
CE – energia de colisão
CEP - Comitê de Ética em Pesquisa
CID – Collision-induced dissociation
COX-1 - Ciclo-oxigenase 1
COX-2 - Ciclo-oxigenase 2
CQ – Controle de qualidade
CHS: chalcona sintase.
CHI: chalcona isomerase.
DFR: dihidroflavonol 4-redutase
CV - voltagem do cone
Da - Unidade de massa atômica (Dalton)
DMSO – Dimetilsulfóxido
RSD - desvio padrão relativo / Relative Standard Deviation
ESI – electrospray ionization
EM - Efeito de matriz
EMA - *European Medicines Agency*
eV - elétron volt
FSH - hormônio folículo estimulante
FSI: flavona sintase.
FHT: flavanona 3-hidroxilase.
FLS: flavonol sintase.
GTs - glucosiltransferases
GC-MS – Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry
GT - Grupo Tratamento
GC - Grupo Controle
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
UHPLC – Ultra High Performance Liquid Chromatography
IC₅₀ - concentração inibitória de 50%
iNO₂ - óxido nítrico sintase
ISO – isopropanol / n-propanol
LOD – Limit of Detection
LOQ – Limit of Quantification
LH - Hormônio luteinizante
LC-MS/MS - Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry
2DLC – cromatografia em fase líquida bidimensional
LC-UV – Liquid Chromatography coupled to Ultraviolet
LLE - extração líquido-líquido

mDa – mili Dalton
MeOH – Metanol
MeOD₄ – Metanol deuterado
mg - miligrama
m/z – razão massa-carga
mL – Mililitro
mL⁻¹ – por mililitro
mm – milímetro
M – concentração molar
PLA-2 - enzima fosfolipase-2
PGs – prostaglandinas
PGF_{2α} – prostaglandina F_{2α}
PGE₂ – prostaglandina E₂
PGE₂-d₄ – prostaglandina E₂ marcada isotopicamente com deutério
PGD₂ – prostaglandina D₂
PGI₂ – prostaglandina I₂
PGG₂ – prostaglandina intermediário endoperóxido G₂
PGH₂ – prostaglandina intermediário endoperóxido H₂
pH – potencial de hidrogênio
pKa – constante de dissociação ácida
PI - padrão interno
QqQ – analisador triplo quadrupolo
Qq-TOF - analisador quadrupolo - tempo de voo (*time-of-flight*)
RDA – retro-DielsAlder
RMN de ¹H - Ressonância magnética nuclear de Hidrogênio 1
SPE – *Solid phase extraction*
SPE-LC-MS/MS – *Solid phase extraction Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*
SRM - *Selected Reaction Monitoring*
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TIC – Total Ion Chromatogram
t_R - Tempo de retenção
u – unidade de massa
UFGT - UDP-glucose flavanona-7-O-glucosiltransferase
UFGRT - UDP-ramnose flavanona glucosídeo-ramnosiltransferase
UDPglucose - difosfato de uridina
µg – micrograma
µL – Microlitro
µm – micrometro
v/v – volume/volume
V - voltagem

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	22
CAPÍTULO I.....	25
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS EM FLUIDO MENSTRUAL POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM LINHA ACOPLADA À CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (SPE-LC-MS/MS)	25
1 INTRODUÇÃO	26
1.1 LC-MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE METABOLITOS EM FLUIDOS BIOLÓGICOS	26
1.1.1 <i>Preparo de amostra: Extração por Fase Sólida</i>	<i>26</i>
1.1.2 <i>Cromatografia em fase líquida e preparo de amostra on-line</i>	<i>29</i>
1.1.3 <i>Cromatografia em fase líquida acoplada à Espectrometria de Massas</i>	<i>29</i>
1.2 PROSTAGLANDINAS E MENSTRUÇÃO	32
1.2.1 <i>Análise de prostaglandinas em matrizes biológicas por LC-MS</i>	<i>35</i>
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 GERAL.....	37
2.2 ESPECÍFICOS.....	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 SOLVENTES E PADRÕES.....	38
3.2 EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS POR SPE <i>ON-LINE</i> E SEPARAÇÃO ANALÍTICA	38
3.3 INSTRUMENTAÇÃO E PARÂMETROS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	38
3.4 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DAS VOLUNTÁRIAS E DIVISÃO DOS GRUPOS	39
3.5 COLETA DAS AMOSTRAS <i>IN VIVO</i>	40
3.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE E SOLUÇÕES DE TRABALHO	40
3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS	41
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 IONIZAÇÃO DAS PROSTAGLANDINAS E PADRÃO INTERNO	43
4.2 PREPARO DE AMOSTRA.....	44
4.3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO POR SPE <i>ONLINE</i> E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	45
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	49
4.4.1 <i>Efeitos avaliados para etapa de diluição da amostra.....</i>	<i>50</i>

4.4.2 Linearidade, exatidão, precisão, LOQ e LOD	54
4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO ÀS AMOSTRAS DE FLUIDO MENSTRUAL ..	57
5 CONCLUSÃO	59
CAPÍTULO II	60
ANÁLISE DE METABÓLITOS SECUNDARIOS DO SUCO DE LIMÃO TAHITI (CITRUS LATIFOLIA) POR LC-DAD E LC-MS/MS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA FRENTE À CICLO-OXIGENASES 1 E 2.	60
1 INTRODUÇÃO	61
1.1 GÊNERO CITRUS – FAMÍLIA RUTACEAE	61
1.2 CITROTERAPIA NO CONTROLE DO FLUXO MENSTRUAL	65
1.2.1 Perfil químico do suco de limão Tahiti	66
1.3 BIOSÍNTESE DE FLAVONOIDES	68
1.4 FLAVONOIDES DE CITROS E INFLAMAÇÃO	71
1.4.1 Inflamação, prostaglandinas e ciclo-oxigenases	73
2 OBJETIVOS	78
2.1 GERAL	78
2.2 ESPECÍFICOS	78
3 MATERIAIS E METODOS	79
3.1 SOLVENTES E PADRÕES	79
3.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	79
3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ULTRAVIOLETA	79
3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS	80
3.5 PREPARO DAS AMOSTRAS	80
3.6 ENSAIO <i>IN VITRO</i> DE INIBIÇÃO DE COX-1 E COX-2	81
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.1 ENSAIOS PRELIMINARES DO SUCO DE LIMÃO TAHITI	83
4.2 EXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA - SPE	85
4.3 ANÁLISE POR CROMATOGRÁFICA LÍQUIDA ACOPLADA A ULTRAVIOLETA	86
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS DE SUCO DE LIMÃO TAHITI POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS	89
4.4.1 Fragmentação de flavonoides glicosilados	90
4.4.2 Fragmentação de flavonoides agliconas	92
4.4 ANÁLISE DA FRAGMENTAÇÃO DOS PADRÕES DE FLAVONOIDES	97
4.4.1 Rutina e Hesperidina	97

4.4.2 Eriocitrina.....	102
4.4.3 Naringina e Narirutina.....	103
4.5 SUBSTÂNCIAS INFERIDAS POR DESREPLICAÇÃO	107
4.5.1 Substância m/z 608,1741 ($C_{28}H_{32}O_{15}$)	107
4.5.2 Substância m/z 578,1630 ($C_{27}H_{30}O_{14}$)	110
4.5.3 Substância m/z 594,1585 ($C_{27}H_{30}O_{15}$)	114
4.6 ENSAIO <i>IN VITRO</i> DE INIBIÇÃO DE COX-1 E COX-2	119
4.7 FLAVONOIDES DO SUCO DE LIMÃO TAHITI E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	122
5 CONCLUSÃO	124
6 CONCLUSÃO GERAL.....	125
REFERÊNCIAS.....	129
ANEXOS	140

1 INTRODUÇÃO GERAL

O ciclo menstrual é classificado em três fases principais: Fase Proliferativa, Fase Secretora e Fase Menstrual, sendo que o desenvolvimento do folículo ovariano depende principalmente do efeito dos hormônios gonadotróficos: hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) (Figura 1).

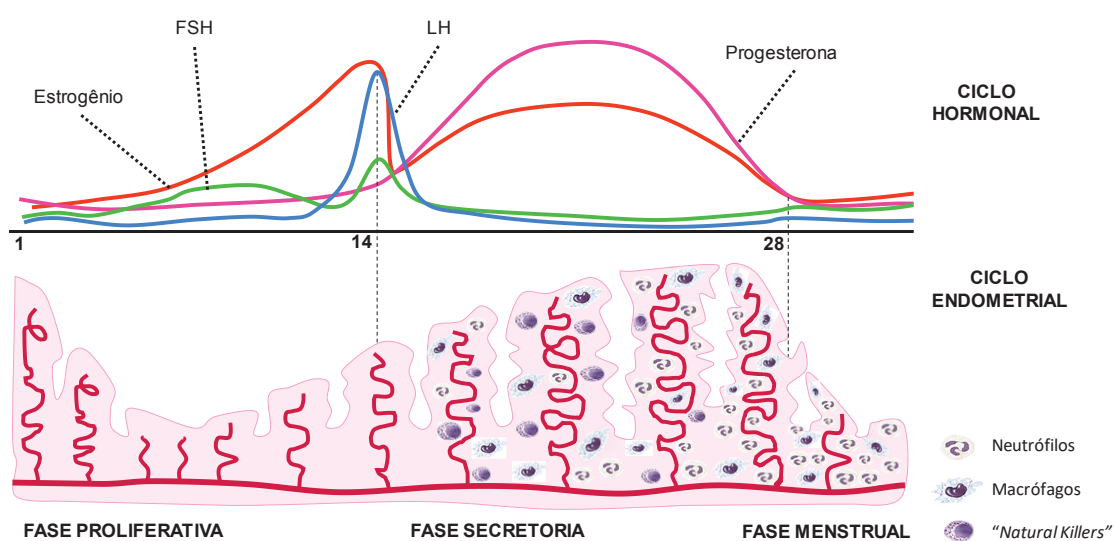


Figura 1. Processo menstrual descrito do ponto de vista do ciclo hormonal e endometrial.
Adaptado de GUYTON e HALL, 2006.

O ovário libera os óvulos e hormônios, estrógenos e progesterona, regulando os processos acima citados (Figura 1). Quando não ocorre a fecundação e implante do óvulo, o tecido é eliminado e a menstruação começa. Isso se deve ao fato de que a queda nos níveis de progesterona e estrógeno, juntamente com o processo de regressão do corpo lúteo (luteolise), estimulam o processo menstrual inflamatório (CUNNINGHAM *et al.*, 2012. KING. CRITCHLEY, 2010. BERBIC. FRASER, 2013)

Alguns eventos específicos caracterizam a menstruação como processo inflamatório, como o elevado direcionamento de leucócitos para o útero, além da formação de edemas e a produção de substâncias pró-inflamatórias. Com a morte celular e a ruptura da membrana fosfolipídica das células, há liberação do ácido araquidônico (AA), pela ação da enzima fosfolipase (PLA-2), o qual é precursor dos eicosanoides. Isso levará a formação de mediadores de inflamação, como as prostaglandinas (PGs), sintetizadas pela via metabólica das ciclo-oxigenases (COXs). Além disso, observa-se o aumento na síntese de proteínas pró-inflamatórias, como

citocinas, quimiocinas, metaloproteínas, encontradas em tecidos inflamatórios (BAIRD et al., 1996. SALAMONSEN. WOOLLEY, 1999. DONG et al., 2002. SUGINO et al., 2004. MAYBIN. CRITCHLEY, 2015).

O processo menstrual representa um exemplo de regulação endócrina o qual, nos casos de disfunção, pode levar a algumas desordens, como cólicas, dismenorrea (dores fortes), sangramento excessivo e prolongado (menorragia) (MORTOLA, 1998. KAGAN. DECHERNEY, 2002. WALLACE. KEIGHTLEY. GIE, 2010. (AZIATO. DEDEY. CLEGG-LAMPTEY, 2014).

O tratamento tradicional para tais disfunções se dá, principalmente, pelo uso de anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs), os quais inibem a síntese de PGs. Entretanto esses medicamentos apresentam efeitos colaterais para o organismo, bem como no sistema reprodutivo feminino, como é o caso de infertilidade (NORMAN. WU, 2004).

Considerando os problemas desse tipo de tratamento, tem-se buscado fontes alternativas, como é o caso dos produtos naturais, que proporcionem segurança e eficácia no controle do sangramento excessivo e outros sintomas da menstruação. Algumas pesquisas têm indicado o potencial do uso de citros para controle de sintomas da menstruação, devido sua elevada atividade anti-inflamatória (OSOSKI et al., 2002. BHATIA et al., 2015. ANDRADE et al., 2015. LV et al., 2015).

Um estudo em andamento está sendo realizado e coordenado pelo professor Dr. Ricardo Borra do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar, o qual tem como objetivo avaliar os efeitos da suplementação com suco de limão Tahiti (*Citrus latifolia*) durante o período menstrual. Para isso, foram selecionadas voluntárias para as quais foi aplicado um questionário para obter informações clínicas de referência sobre o ciclo menstrual individual. Dados preliminares mostraram significativa redução da intensidade (72%) e duração do período menstrual (23%) das voluntárias, além da redução da formação de coágulos (43%) e ausência de dismenorrea (21%) após uso do suco de limão Tahiti, como tratamento alternativo para desordens menstruais (ANDRADE et al., 2015).

Considerando que os sucos de frutos de citros apresentam em sua composição química flavonoides como principais metabólitos (NOGATA et al., 2006), levanta-se a hipótese de que o mecanismo de regulação do sangramento excessivo, bem como outras desordens associadas ao ciclo menstrual, seria controlado pela ação desses compostos. Sendo que, uma das principais atividades dos flavonoides é a inibição de

processos inflamatórios, atuando na inibição das enzimas ciclo-oxigenases (COXs), modulando, assim, a biossíntese de prostaglandinas através da inibição, principalmente, da enzima COX-2 (KUMMER. COELHO, 2002. MURIAS et al., 2004. VERMA. PRATAP, 2010. SHALINI. JAYALEKSHMI. HELEN, 2015). Já é bem estabelecida a presença de prostaglandinas no sangue menstrual, principalmente $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 , as quais teriam um importante papel na cascata de eventos que levam à menstruação (BAIRD et al., 1996).

Assim, o presente projeto teve como objetivos:

Capítulo I: desenvolver e validar um método por SPE-LC-MS/MS para a quantificação de prostaglandinas (PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$) em fluido menstrual e aplicação do método para dois grupos de amostras de fluido menstrual: grupo controle (sem tratamento) e grupo tratamento (suplementado com suco de limão Tahiti).

Capítulo II: realizar o estudo do perfil químico do suco de limão Tahiti (*Citrus latifolia*) e atividade de inibição enzimática de ciclo-oxigenases 1 e 2.

Ambas as metodologias foram desenvolvidas usando extração em fase sólida, como preparo de amostra, e cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas, como técnicas de análise.

CAPÍTULO I

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE PROSTAGLANDINAS EM FLUIDO MENSTRUAL POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM LINHA ACOPLADA À CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (*SPE-LC-MS/MS*)

1 INTRODUÇÃO

1.1 LC-MS PARA QUANTIFICAÇÃO DE METABOLITOS EM FLUIDOS BIOLOGICOS

A cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS: *liquid chromatographic-mass spectrometry*) tem se destacado muito nos últimos anos para a identificação de metabólitos em fluídos biológicos, devido a garantia de análises confiáveis, reprodutíveis e exatas. Além de que a combinação de ambas as técnicas fornece sensibilidade e seletividade suficiente para detecção e quantificação de baixíssimas concentrações de analitos de interesse (NOVÁKOVÁ. VLČKOVÁ, 2009. HOLČAPEK. JIRÁSKO. LÍSA, 2012).

Algumas das aplicações da técnica de LC-MS são encontradas em estudos de identificação e quantificação de metabólitos em matrizes biológicas, produtos naturais, análises toxicológicas, alimentos, fármacos, entre outras (PITT, 2009).

Fluidos biológicos se caracterizam por serem matrizes de alta complexidade, devido ao fato de apresentarem uma infinidade de compostos, desde macromoléculas, como proteínas, a inúmeras classes de metabólitos endógenos e exógenos (TRUFELLI et al., 2010).

A análise cromatográfica de matrizes biológicas complexas, como soro e plasma, apresenta dificuldades quanto à coeluição de compostos quimicamente semelhantes, o que interfere na seletividade das análises. Enquanto que na espectrometria de massas, o problema está relacionado com a ionização dos analitos, podendo haver supressão ou aumento de sinal, o que prejudica e inviabiliza a correta quantificação, uma vez que interfere em outros parâmetros do método, como reprodutibilidade, exatidão e precisão (TRUFELLI et al., 2010. PANUWET et al., 2016).

Os passos para o desenvolvimento de um método por LC-MS basicamente consistem em coleta, preparo da amostra e separação seguida pela detecção dos analitos da amostra.

1.1.1 Preparo de amostra: Extração por Fase Sólida

O preparo de amostra é uma das etapas mais importantes do método analítico, pois é nessa etapa que se obtém a fração de interesse em condições otimizadas e

seguras para realização de uma boa análise (CASSIANO. BARREIRO. CASS, 2014). Torna-se uma etapa bastante crítica, pois influencia em todo o processo de identificação e quantificação, por isso deve fornecer reprodutibilidade, precisão e exatidão para as etapas seguintes, principalmente quando se trata de um método quantitativo.

É de extrema importância que nessa etapa se tenha o menor manuseio possível da amostra, que o método seja simples, rápido e econômico, e que esteja de acordo com os procedimentos considerados sustentáveis para o meio ambiente (MULLETT, 2007. (FILIPPOU. BITAS. SAMANIDOU, 2017).

A SPE (do inglês: *Solid Phase Extraction*) ou Extração por Fase Sólida (EFS) é uma técnica de separação sólido-líquido, utilizada para extração ou limpeza de amostras complexas. Nessa etapa é possível a pré-separação dos analitos de interesse perante outros compostos presentes na matriz, considerados interferentes. obtendo-se, assim, uma fração enriquecida dos compostos a serem analisados. A concentração do analito constitui a razão entre quantidade inicial de amostra pela quantidade final de solução concentrada (JARDIM, 2010). Trata-se, ainda, de um preparo de amostra eficiente e compatível com a cromatografia líquida e outras técnicas relacionadas (NOVÁKOVÁ. VLČKOVÁ, 2009. LI. RIVORY. CLARKE, 2006).

As fases estacionárias dos cartuchos de SPE são muito similares às utilizadas em cromatografia líquida em coluna, como: C18, sílica, troca iônica e fases poliméricas. sendo os mecanismos de separação: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica ou exclusão. A fase sólida do cartucho é escolhida de acordo com os analitos e matriz de interesse, objetivando-se a melhor eficiência de extração (JARDIM, 2010).

Dentre as fases estacionárias poliméricas destacam-se as chamadas Oasis HLB (Waters), sendo constituídas por um adsorvente universal para compostos ácidos, básicos e neutros, compostas pelos monômeros N-vinilpirrolidona (hidrofílico) e divinilbenzeno (lipofílico), proporcionando alta capacidade de retenção em fase reversa, sendo, ainda, estável a faixas de pH extremas e abrangendo uma ampla faixa de polaridade de solventes e de analitos.

Os cartuchos de SPE são encontrados na forma de seringas, os quais são aplicados nos procedimentos denominados SPE *off-line*. Ou na forma de pequenas colunas cromatográficas, sendo utilizados nos processos conhecidos como *on-line* (Figura 2).

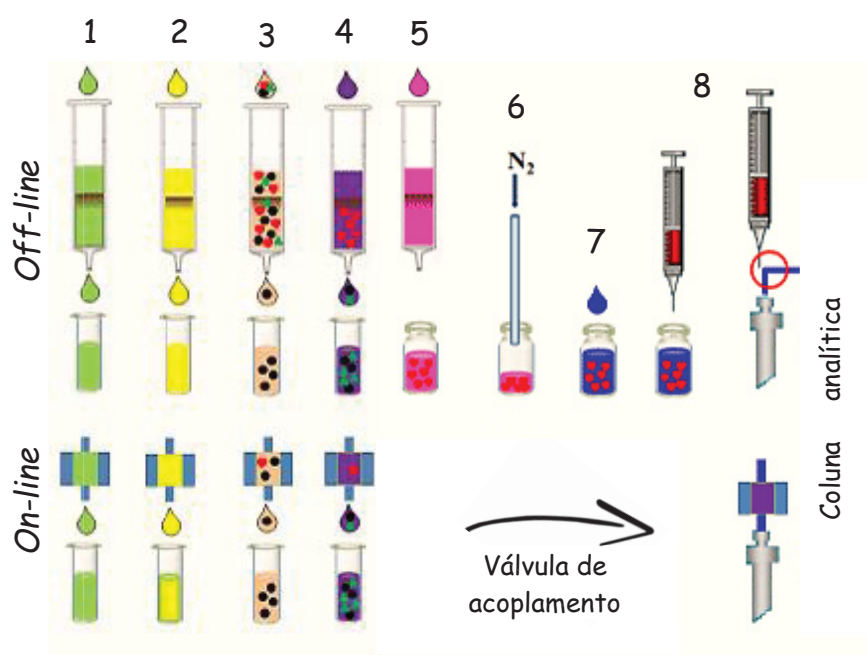


Figura 2. Procedimento de SPE *off-line* (acima). Procedimento de SPE *on-line* (abaixo). Etapas: 1. Ativação. 2. Condicionamento. 3. Carregamento da amostra. 4. Limpeza dos interferentes. 5. Eluição da fração de interesse. 6. Evaporação. 7. Reconstituição e 8. Injeção. Adaptado de Boonjob, 2014.

O procedimento básico de SPE envolve os seguintes passos: ativação e condicionamento do adsorvente (fase estacionária), carregamento da amostra, limpeza dos interferentes e eluição dos analitos de interesse. No método *off-line* há a necessidade de evaporação do solvente da amostra após a eluição e então reconstituição da mesma para posterior análise.

A eficiência do processo de extração é medida pela capacidade de retenção do analito de interesse no adsorvente e facilidade de remoção, bem como separação desse dos interferentes (JARDIM, 2010).

Diante da grande demanda do uso de SPE e da necessidade de desenvolvimento de métodos cada vez mais rápidos e eficientes, principalmente para análises laboratoriais de rotina, houve o surgindo dos sistemas de preparo de amostra *on-line* ou em linha (BOONJOB, 2014). Isso se fez possível principalmente aos avanços na cromatografia líquida multi ou bidimensional (2DLC) (MALEROD. LUNDANES. GREIBROKK, 2010. MOGOLLÓN et al., 2014).

1.1.2 Cromatografia em fase líquida e preparo de amostra *on-line*

Cromatografia em fase líquida é uma técnica de separação físico-química, na qual a separação de uma mistura em solução se dá pelo princípio de distribuição e interação da amostra entre uma fase estacionária (coluna cromatográfica) e uma fase móvel (solvente) (CASS. DEGANI, 2009).

Diante da complexidade requerida para análises biológicas, a cromatografia convencional tem se tornado obsoleta quanto aos parâmetros de resolução, capacidade de pico e seletividade. Sendo assim, a miniaturização da técnica cromatográfica, levou ao surgimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) (MALDANER. JARDIM, 2009) bem como ao surgimento dos sistemas bidimensionais. Devido a esses avanços foi possível a realização de preparo de amostras automatizado, como a técnica de SPE *on-line*.

O sistema de preparo de amostra *on-line* funciona pelo acoplamento do cartucho de preparo de amostra à coluna analítica, por meio de uma válvula de múltiplas portas e uma bomba. A retenção dos analitos de interesse é realizada no cartucho de SPE, seguido da remoção de interferentes. e posterior eluição da fração concentrada para a coluna analítica, que é a responsável pela separação cromatográfica (GUTTMAN. VAROGLU. KHANDURINA, 2004. DIXON. PITFIELD. PERRETT, 2006. LOPES. CASSIANO, 2016. PENG et al., 2016).

Algumas das vantagens da *SPE on-line* são: maior segurança para o operador, devido ao menor manuseio de amostra. menor tempo de preparo, devido ao fato de eliminar etapas como evaporação e reconstituição da amostra, necessárias no modo *off-line* (Figura 2). redução de perda de analito, além de maior eficiência e reprodutibilidade diante da automatização do sistema (BOONJOB, 2014).

1.1.3 Cromatografia em fase líquida acoplada à Espectrometria de Massas

A cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas (*LC-MS*) tem sido utilizada com muito sucesso ao longo dos anos como principal técnica para desenvolvimento de métodos bioanalíticos. A aplicação dessa técnica em estudos de metabolômica, proteômica, genômica, desenvolvimento de novos fármacos,

caracterização e identificação de substâncias e seus metabólitos, são alguns exemplos.

O acoplamento da *LC* com a *MS* proporcionou análises com alto grau de seletividade e sensibilidade. Para isso o primeiro passo requerido é converter a amostra líquida, proveniente do *LC*, para íons em fase gasosa para detecção no analisador de massas. O maior desafio, no entanto, foi a criação de uma interface que viabilizasse esse processo. Diante disso, o desenvolvimento de fontes de ionização como a *ESI* (*electrospray ionization*) ou ionização por eletrospray (Figura 3), tornou possível a vaporização dos analitos, possibilitando realizar análises de amostras em fase líquida com posterior detecção por espectrometria de massas (LANÇAS, 2009).

Resumidamente, o mecanismo da *ESI* consiste na ionização das moléculas pela aplicação de um potencial elétrico no cone de volatilização, uma vez que a fase líquida, proveniente do *LC*, é direcionada por um capilar de alta voltagem à pressão atmosférica e, ao sair do capilar, formam-se pequenas gotas em forma de spray, altamente carregadas. Nesse momento, um fluxo de gás contínuo (N_2) faz a dessolvatação das gotas à medida que se deslocam. O gás faz evaporar as moléculas do solvente, fazendo com que o campo elétrico das gotas carregadas (positiva/negativamente) aumente, até que a repulsão das cargas superficiais seja tão intensa que supere a tensão superficial da gota, levando a chamada explosão coulômbica. Formando, assim, os íons, os quais são direcionados (focalizados) para o analisador a fim de serem detectados por sua razão massa/carga (m/z) (FENN et al., 1989. CROTTI et al., 2006. KEBARLE. VERKCERK, 2009).

Os analisadores de massas híbridos são basicamente classificados de acordo com sua capacidade de medida (exatidão) e poder de resolução que podem atingir na medida de massa necessária. Outra classificação diz respeito a forma como os eventos de separação dos analisadores são realizados, se são por “tempo” ou no “espaço”.

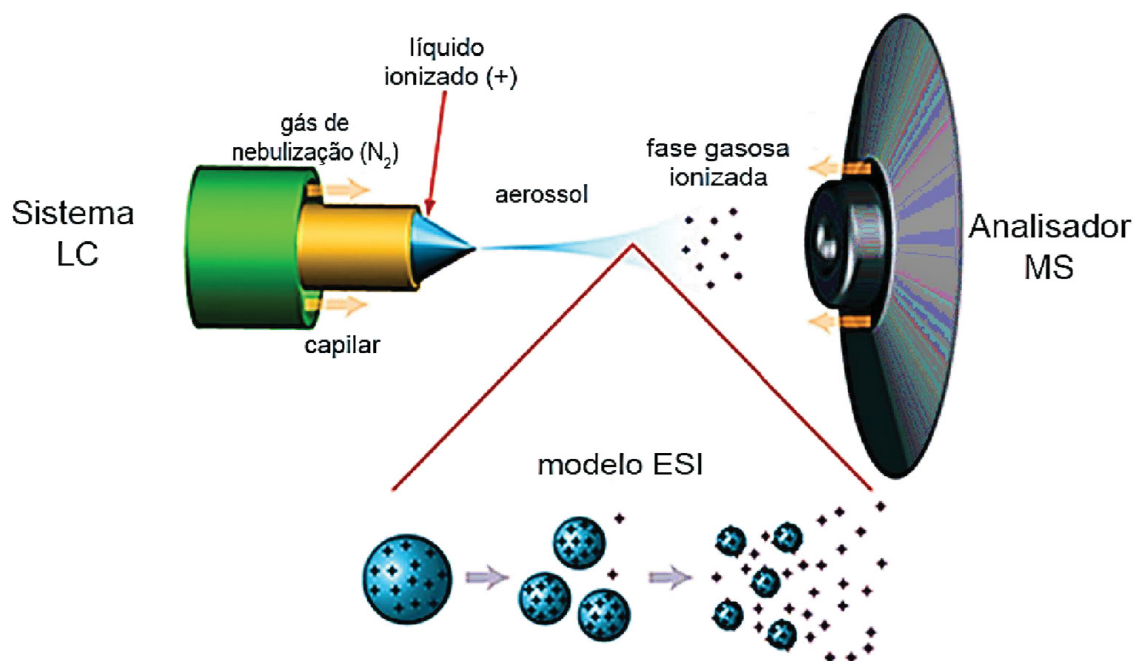


Figura 3. Mecanismo de Ionização por *ElectroSpray* (ESI). Fonte: SIMOES, 2013.

Analísadores sequenciais, em que cada estágio de separação massa-carga é realizado em espaços físicos diferentes dentro do espectrômetro, são denominados de analisadores no espaço. Exemplo disso, são o triplo quadrupolo (QqQ) e quadrupolo-tempo de voo (do inglês, *Time of Flight*, sigla Qq-TOF) (Glish & Burinsky, 2008). Sendo esses dois importantes analisadores atualmente empregados tanto para análise de fluidos biológicos quanto para amostras de produtos naturais.

Para análises quantitativas o analisador de massas mais empregado tem sido o triplo quadrupolo, o qual é um híbrido de três quadrupolos sequenciais (Figura 4). Sua capacidade de filtrar íons de acordo com a razão massa-carga (m/z) é o que lhe confere alta sensibilidade, além da possibilidade de realizar diversos experimentos, dentre eles o *SRM* (*Selected Reaction Monitoring*) ou monitoramento de reação selecionada (Figura 5). Nesse modo os analisadores fornecem maior sensibilidade e seletividade à análise. O primeiro quadrupolo (Q1) faz a varredura do íon precursor selecionado. o segundo (q2) compartimento é conhecido como cela de colisão, onde é induzida a colisão dos íons com um gás inerte (Ar, He ou N₂), produzindo os fragmentos do íon precursor selecionado. enquanto que no terceiro quadrupolo (Q3) é onde ocorre a seleção dos íons fragmento gerados, o qual será reconhecido no detector. Enquanto um íon é detectado, outro fragmento é gerado na cela e, posteriormente, filtrado em Q3, sucessivamente.

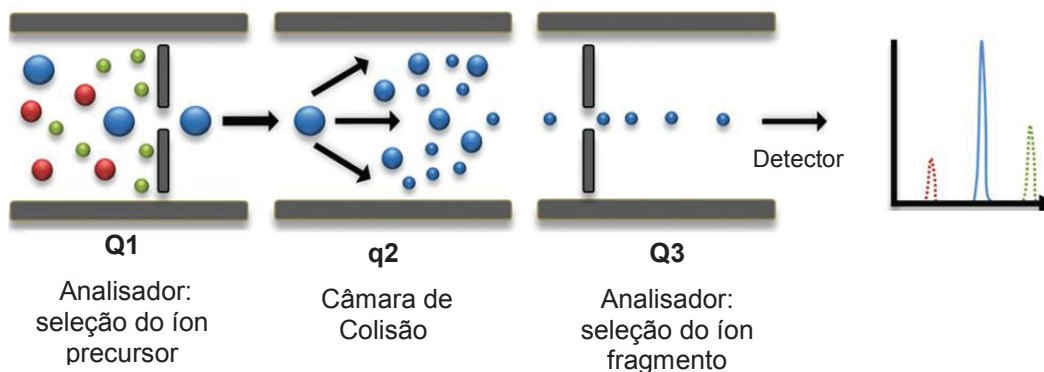


Figura 4. Analisador triplo quadrupolo (QqQ). Adaptado de (BOJA. RODRIGUEZ, 2011).

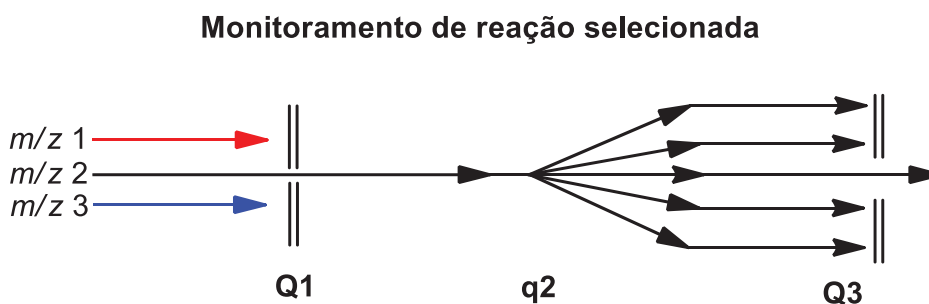


Figura 5. Experimento de monitoramento de reação selecionada (SRM) em analisador de massas triplo quadrupolo. Adaptado de SIMOES, 2013.

Outro tipo de analisador de massas híbrido amplamente utilizado é o *Qq-TOF*, o qual é composto pela sequência de dois quadrupolos e, por último, um analisador de tempo de voo. De forma simples, o conceito de tempo de voo consiste na identificação dos íons pelo tempo que esses gastam para percorrer uma distância definida dentro do equipamento, do momento em que são gerados até o detector, o que está diretamente relacionado com sua massa. Assim, íons mais leves chegam antes no detector, devido a trajetória mais rápida. enquanto que íons mais pesados são detectados depois. Esse é um analisador de alta resolução de massas, possibilitando diferenciação de m/z inferior a 2 mDa (ENS. STANDING, 2005).

1.2 PROTAGLANDINAS E MENSTRUACÃO

Prostaglandinas (PGs) são metabólitos endógenos pertencentes à classe dos eicosanoides, derivados do ácido araquidônico (AA) e são importantes lipídios

mediadores de processos inflamatórios. São metabólitos extracelulares, enquanto que seus receptores estão ligados às proteínas-G, presentes na membrana plasmática celular. PGs são biossintetizadas pela via das ciclo-oxigenases (COXs) (SUGINO et al., 2004. BAIRD et al., 1996. KAGAN. DECHERNEY, 2002) (Figura 6). O mecanismo da biossíntese das COXs é explicado detalhadamente no Capítulo II, item 1.4.1.

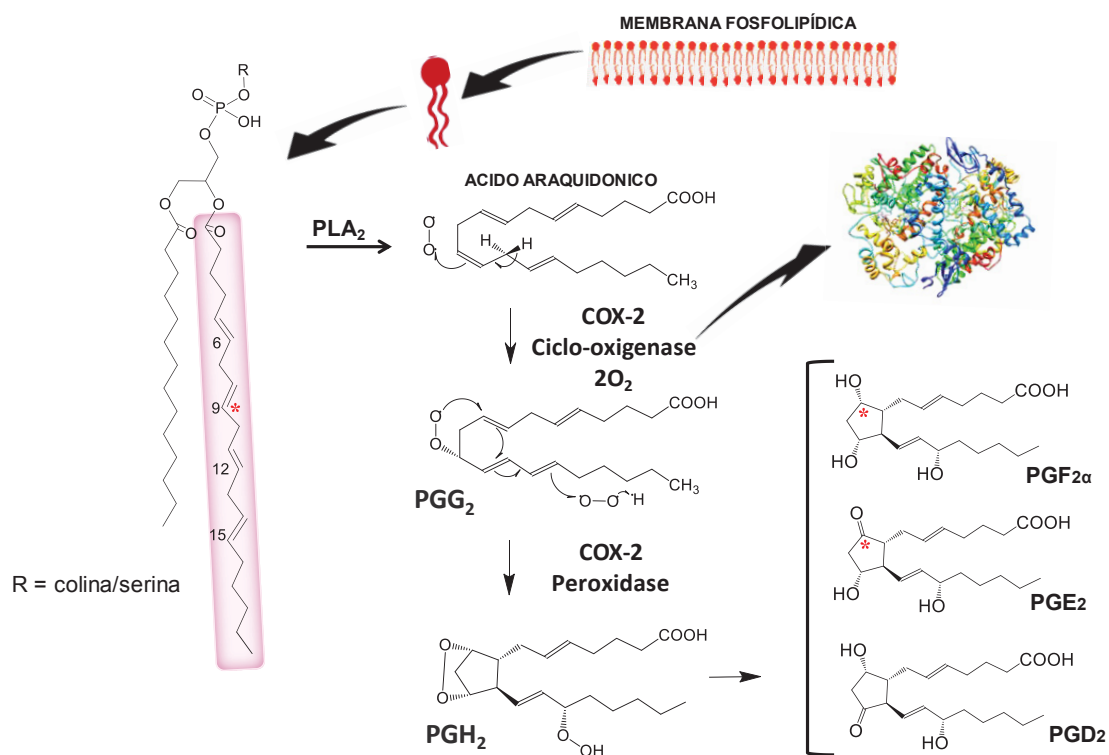


Figura 6. A queda dos hormônios progesterona e estradiol, juntamente com a morte celular, ativa a enzima fosfolipase-2 (PLA-2) que atua na ruptura da membrana fosfolipídica da membrana celular, liberando o ácido araquidônico (AA), o qual é precursor dos eicosanoides. Pela ação da COX-2 o AA é metabolizado em diferentes prostaglandinas, como é o caso da PGF_{2α} e PGE₂. Fonte: autor.

A biossíntese das prostaglandinas, descrita na Figura 6, mostra o ácido araquidônico (AA) sendo ciclizado para formação do intermediário endoperóxido PGG₂ e, posteriormente, reduzido pelo sítio ativo peroxidase para formar o intermediário PGH₂. Estes dois endoperóxidos são quimicamente instáveis, fazendo com que sejam metabolizados enzimaticamente em diferentes produtos, levando a produção das prostaglandinas: PGD₂, PGE₂ ou PGF_{2α}. Essas séries de prostaglandinas (D, E e Fα) são denominadas de 'prostaglandinas primárias' e o número subscrito, como PGE₂, é referente a localização da ligação dupla exocíclica do anel (SIMMONS, 2004. BOTTING, 2006).

Na menstruação, a queda dos níveis de progesterona e estradiol, aumentam a expressão de COX-2, o que resulta no aumento da produção de prostaglandinas pelas células do estroma junto com aumento na densidade do receptor de PGs nos vasos sanguíneos e nas células circundantes (CUNNINGHAM et al., 2012).

As prostaglandinas (PGs) desempenham um importante papel no útero e, consequentemente, na cascata de evento que levam à menstruação, estando envolvidas em processos como: parto, vasodilatação e vasoconstrição, ovulação e contração do miométrio, atuando como mediadores químicos na regulação positiva de respostas pró-inflamatórias (CUNNINGHAM et al., 2012. KING. CRITCHLEY, 2010). Distúrbios menstruais, como dismenorreia primária e sangramento excessivo, em ausência de patologias, tem sido associada ao desequilíbrio na síntese de prostaglandinas (CATALANO et al., 2011).

PGE₂ e PGF_{2α} são as principais prostaglandinas encontradas no endométrio e no sangue menstrual (BAIRD et al., 1996. SMITH. JABBOUR. CRITCHLEY, 2007). Estas estão relacionadas com a contração/dilatação do músculo liso, enquanto PGE₂ diminui a contração, atuando como vasodilatadora. PGF_{2α} aumenta, atuando como vasoconstritora (KAGAN. DECHERNEY, 2002). Esse efeito de vasoconstrição/vasodilatação leva à diminuição de oxigênio e a produção de espécie reativas de oxigênio (EROs), o que causa o efeito de *feedback* positivo da expressão de COX-2 e aumento dos níveis de PGs (EVANS. SALAMONSEN, 2012. SUGINO et al., 2004).

PGE₂ também atua nos vasos sanguíneos do endométrio juntamente com a proteína interleucina (IL-8), aumentando o direcionamento de leucócitos para o tecido endometrial (COLDITZ, 1990). Elevadas quantidades de PGF_{2α} tem sido atribuído a contrações do músculo liso uterino levando à diminuição do fluxo menstrual, o que também tem sido relacionado a uma das causas de menorragia. Outra explicação complementar se refere à ação da PGF_{2α} como mediador secundário da menstruação, induzindo a contração das artérias espiraladas do endométrio, privando as camadas superiores do tecido endometrial de oxigênio, levando a perda de sangue pela ruptura dos vasos e, consequente, morte do tecido (KAGAN. DECHERNEY, 2002).

Ambas PGF_{2α} e PGE₂ são quimicamente muito semelhantes, sendo que a única diferença estrutural entre elas é a presença de um grupo hidroxila no anel de cinco membros (C-9*, simbolizado por asterisco em vermelho na Figura 6) em PGF_{2α}, enquanto que em PGE₂ há uma carbonila (grupo C=O) na mesma posição.

1.2.1 Análise de prostaglandinas em matrizes biológicas por LC-MS

Os métodos analíticos descritos na literatura para a análise de PGs em fluidos biológicos baseiam-se principalmente em imunoensaios ou cromatografia em fase gasosa-espectrometria de massas (GC-MS), os quais requerem reagentes específicos e caros ou derivatização da amostra, respectivamente (TSIKAS. ZOERNER, 2014. TSIKAS, 2016).

Mais recentemente, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) tem emergido como a técnica líder para esta aplicação, possibilitando análises rápidas e sensíveis, devido a sua versatilidade e compatibilidade com amostras biológicas (DEEMS et al., 2007. CAO et al., 2008. ARAUJO et al., 2014).

O preparo de amostra utilizado para extração de PGs, em geral, são: extração líquido-líquido (*LLE*), precipitação de proteína (PP), extração por fase sólida (*SPE*), ou ainda, a combinação de mais de uma técnica tem sido relatada (KOMABA et al., 2009. KORTZ. DOROW. CEGGLAREK, 2014). Tratando-se de extração por fase sólida, a *SPE off-line* é a mais frequentemente utilizada, apesar do longo e exaustivo procedimento. Em geral, a *LLE* ainda é prevalecente.

Considerando que os procedimentos *off-line* geralmente resultam em perda do analito e possível degradação do mesmo, além do problema já citado com consumo de tempo que esses protocolos requerem, sistemas *on-line* superam esses problemas.

Dados da literatura nos últimos anos para análises de prostaglandinas por LC-MS mostram poucos trabalhos utilizando métodos *on-line* de preparo de amostra, e desses, a grande maioria trata-se de análises em meio celular ou tecido, poucos sobre plasma ou soro (Tabela 1).

Tabela 1. Prostaglandinas avaliadas em matrizes biológicas.

Matriz	Prostaglandinas	Preparo de amostra	Referência
Mucosa e pólipos	PGE ₂	<i>LLE</i>	(YUN et al., 2018)
Líquido folicular ovariano	PGF _{2α} - PGF _{1α} - PGE ₂ - 8-iso-PGF _{2α} - 15-F ₂ -isoprostane	<i>LLE</i>	(PIER et al., 2018)
Tecido cerebral	PGF _{2α} - PGE ₂ - PGE _{1α} - PGD ₂	Solvente + Centrifugação	(GOBO et al., 2018)
Plasma humano	PGF ₁ - PGF _{2α} - PGE ₂ - PGD ₂ - PGJ ₂	<i>SPE off-line</i>	(MILLER et al., 2017)
Plasma de animal	PGF _{2α} - PGE ₂ - PGD ₂	<i>PP + SPE on-line</i>	(TEPPNER et al., 2016)
Tecido animal e plasma humano	PGF _{2α} - PGE ₂ - PGD ₂ (padrões deuterados)	<i>SPE</i> 96 poços	(LUBIN et al., 2016)
Água de esgoto	8-iso-PGF _{2α}	Imunoafinidade (<i>spin-cartridges</i>) <i>off-line</i>	(RYU. REID. THOMAS, 2015)
Meio de cultura celular	PGD ₂ - PGE ₂	<i>SPE on-line</i>	(WILLENBERG. MESCHEDÉ. SCHEBB, 2015)
Lisado celular e meio de cultura	PGE ₃ - PGD ₃ - PGF _{3α}	<i>LLE e SPE off-line</i>	(TANAKA et al., 2014)
Plasma de animal	PGE ₁	<i>LLE</i>	(ZHANG et al., 2013)
Soro humano	PGE ₃ - PGF _{2α} - PGE ₂ - PGF ₁ - PGD ₂	<i>SPE on-line</i>	(FERREIRO-VERA et al., 2011)
Meio de cultura celular	PGD ₂ - PGE ₂	<i>LLE</i>	(CAO et al., 2008)

LLE: liquid-liquid extraction. SPE: solid phase extraction. PP: protein precipitation. *Na tabela são citadas apenas as prostaglandinas avaliadas, sendo que outros compostos também foram avaliados em alguns casos.

Considerando análises com grande número de amostra ou amostras com grande variabilidade em seu conteúdo, como é o caso de fluidos corporais, há uma grande importância no desenvolvimento de métodos rápidos, reprodutíveis e eficientes, que possam ser aplicadas ao uso clínico.

Diante do exposto esse trabalho propôs o desenvolvimento e validação de um método para quantificação de PGF_{2α} e PGE₂ em fluido menstrual utilizando a técnica de extração por fase sólida *on-line* com cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O presente capítulo tem como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia para a quantificação de prostaglandinas em soro humano e aplicação do mesmo em fluido menstrual de pacientes antes e após a ingestão do suco do limão Tahiti (*Citrus latifolia*), a fim de estabelecer uma relação da influência da suplementação do suco para o controle do sangramento menstrual excessivo.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Desenvolver e validar um método para quantificação das prostaglandinas PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ em soro humano, como matriz *surrogate*, utilizando extração *on-line* SPE e análise por LC-MS/MS.

2. Aplicar o método desenvolvido para análise de amostras de fluido menstrual de pacientes do grupo controle e tratado com suco do limão Tahiti para verificar a variação dos níveis de PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$.

Essas análises foram desenvolvidas no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos - SP, no laboratório Separare, sob supervisão da Profa Dra Quezia B. Cass e Profa Dra Maria Fátima F. da Silva.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SOLVENTES E PADRÕES

Para o preparo das amostras e as análises cromatográficas foram utilizados solventes orgânicos grau HPLC Mallinckrodt Baker (St. Louis, USA). A água utilizada para fase móvel foi purificada usando sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brazil). Ácido fórmico ($\geq 95\%$) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

Prostaglandinas: PGE₂ (ácido 9-oxo-11 α , 15S-di-hidroxi-prosta-5Z, 13E-dien-1-oico), PGF_{2 α} (ácido 9 α ,11 α , 15S-tri-hidroxi-prosta-5Z, 13E-dien-1-oico) e o padrão interno (PI) PGE₂-d₄ (ácido 9-oxo-11 α , 15S-di-hidroxi-prosta-5Z, 13E-dien-1-oic-3,3,4,4-d₄) foram adquiridos da Cayman Chemical (Michigan, USA). As soluções padrão e estoque preparadas foram armazenadas à -20°C.

As fases móveis foram preparadas na razão volume/volume.

3.2 EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS POR SPE *ON-LINE* E SEPARAÇÃO ANALÍTICA

O método foi desenvolvido usando o sistema bidimensional de cromatografia líquida de ultra eficiência ACQUITY UPLC (Waters, Milford, USA), composto de uma bomba binária Acquity (BSM), uma bomba quaternária (QSM) Acquity H-Class. Auto-injetor modelo 2777C (CTC PAL) equipado com *loop* de injeção de 10 μ L, uma válvula de injeção de seis caminhos Everflow[®] e outra válvula para o acoplamento LC-LC Everflow[®].

A posição das válvulas foi definida por eventos controlados pelo software MassLynx.

3.3 INSTRUMENTAÇÃO E PARÂMETROS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O sistema cromatográfico foi acoplado ao espectrômetro de massas Xevo[™] TQ-MS (Waters, Milford, USA) equipado com uma fonte de ionização ortogonal Z-spray[™] ESI (ionização por *eletrospray*), operando no modo negativo, nas seguintes condições:

Temperatura da fonte: 150 °C. voltagem do capilar: 2,5 kV. fluxo do gás de solvatação: 600 L h⁻¹. temperatura do gás de solvatação: 200 °C. fluxo do gás de cone: 0,10 mL min⁻¹. fluxo de gás de colisão: 0,15 mL min⁻¹. *dwell time*: 0,350 ms.

Nitrogênio foi utilizado como gás de cone e de dessolvatação, e argônio como gás de colisão. As energias de colisão (CE) e voltagens do cone (CV) foram manualmente otimizadas para cada analito por infusão direta de 1 µg mL⁻¹ de cada solução individual com vazão de 50 µL mL⁻¹ pela bomba seringa combinado com o fluxo da fase móvel.

O espectrômetro de massas operou no modo de Monitoramento de Reação Seleccionada (*SRM*).

O controle instrumental e análise dos dados foram feitos usando o software MassLynx 4.1 (Waters, Milford, USA).

3.4 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DAS VOLUNTÁRIAS E DIVISÃO DOS GRUPOS

As voluntárias participantes deste estudo foram selecionadas de acordo com os critérios abaixo e após assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (parecer nº 2.030.659) (ANEXO 1).

Crítérios de inclusão/exclusão: mulheres entre 18 e 40 anos. sem uso de anticoncepcional hormonal. sem histórico de doenças ginecológicas, autoimune, neoplasia maligna ou histórico de rádio/quimioterapia. que não praticasse atividade física intensa ou que tivesse alterado recentemente o padrão de atividade. que não fizesse uso crônico de fármacos, como anti-inflamatório não esteroidal, imunossupressor, ansiolíticos ou antidepressivos. e ainda, que não tivesse feito uso de medicação contínua em período inferior a 15 dias antes do estudo.

Para a seleção, as voluntárias responderam a um questionário sobre seu ciclo menstrual. Os questionamentos foram a respeito da regularidade do ciclo, tempo de duração da menstruação, presença/ausência de cólicas e coágulos, e sobre o uso de medicamentos para essas desordens.

Após a seleção, as voluntárias foram divididas aleatoriamente em dois grupos: Grupo Tratado (GT, n=4) e essas foram orientadas a ingerir o suco de um limão Tahiti (dose de 20 mL), diluído em água no início do sangramento (30 min antes das refeições) e outra dose igual no segundo dia da menstruação, pela manhã, pelo menos

3h antes da coleta. Os frutos frescos foram adquiridos sempre da mesma fonte, em comércio local, e entregue às voluntárias na semana da coleta. O segundo grupo, Grupo Controle (GC, n=7) foi orientado a não ingerir nenhum tipo de medicação e a não consumir frutas cítricas durante os primeiros dias da menstruação. Ambos os grupos foram acompanhados por 2 meses consecutivos e a administração foi realizada da mesma forma nos diferentes meses.

Outras 10 voluntárias foram selecionadas para coleta de sangue periférico, para essas os critérios de seleção foram: estar fora do período menstrual e não apresentar nenhum processo inflamatório ativo.

3.5 COLETA DAS AMOSTRAS *IN VIVO*

O sangue periférico foi coletado de 10 voluntárias saudáveis usando tubos à vácuo sem anticoagulante (Vacutainer Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Após coletado, o sangue foi deixado para coagular por 20 min à 25°C e então centrifugado por 10 minutos (1000 x g). O soro foi separado das células e o sobrenadante armazenado à -80 °C até a realização das análises.

O fluido menstrual foi coletado utilizando coletor menstrual (Menstrual Lunette Collector, Kevosai, Curitiba, Brazil). Cada voluntária recebeu um coletor para uso individual durante o estudo. A coleta foi realizada pela manhã, no segundo dia da menstruação, por 2 meses consecutivos. As voluntárias fizeram a coleta no próprio laboratório e as amostras foram imediatamente centrifugadas por 10 minutos (1000 x g), e o sobrenadante armazenado à -80 °C até a realização das análises.

3.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE E SOLUÇÕES DE TRABALHO

Solução estoque da mistura de PGE₂ (20,0 µg mL⁻¹) e PGF_{2α} (20,0 µg mL⁻¹) foi preparada em H₂O:MeOH (50:50, ácido fórmico 0,1%, v/v).

A solução estoque do padrão interno (PI) PGE₂-d4 (300 ng mL⁻¹) foi preparada em H₂O:MeOH (90:10, ácido fórmico 0,1%, v/v).

A partir da solução estoque, 11 soluções de trabalho dos padrões PGE₂ e PGF_{2α} foram preparadas em H₂O (ácido fórmico 0,1%, v/v), nas seguintes concentrações: 0,15. 0,30. 0,75. 1,5. 2,3. 3,0. 6,0. 9,0. 12. 15 e 18 µg mL⁻¹. Essas soluções de trabalho foram utilizadas para o preparo dos padrões de calibração.

As soluções de trabalho dos controles de qualidade foram preparadas a partir da solução estoque para obtenção das seguintes concentrações: 0,450. 7,50 e 13,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em H_2O (ácido fórmico 0,1%, v/v). Essas soluções de trabalho foram utilizadas para o preparo das amostras de controle de qualidade (CQ).

Todas as soluções de trabalho foram armazenadas à -20°C até a realização das análises.

3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras individuais de soro periférico ($n=10$) foram misturadas e então diluídas (1:1) na solução de PI (300 ng mL^{-1}). Os padrões de calibração foram preparados frescos no dia da análise usando o soro periférico diluído como matriz *surrogate*. 10 μL das soluções de trabalho dos padrões de calibração e dos CQs (item 3.6) foram adicionados em 290 μL do soro diluído, homogeneizado em vórtex por 10 segundos e então centrifugado ($1,5 \times g$, 10min, 4°C). O sobrenadante (200 μL) de cada amostra foi transferido para o vial do auto-injetor e injetados no sistema SPE-LC-MS/MS.

As concentrações finais dos padrões de calibração foram 10,34. 20,70. 51,72. 103,5. 155,2. 206,9. 413,8. 620,7. 827,6, 1034 e 1241 ng mL^{-1} . E para os CQs: 31,03. 517,2 e 931,0 ng mL^{-1} . Os padrões de calibração foram preparados em triplicata e os CQs em quintuplicata.

O fluido menstrual de cada voluntária (150 μL) foi diluído (1:1) na solução de PI (300.0 ng mL^{-1}) (150 μL), homogeneizado em vórtex por 10 segundos e então centrifugado ($1,5 \times g$, 10min, 4°C). Uma alíquota de 200 μL do sobrenadante foi transferido para o vial do auto-injetor e injetados no sistema SPE-LC-MS/MS.

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método foi realizada de acordo com o guia *European Medicines Agency* (EMA, 2011).

A seletividade foi avaliada comparando amostras sem adição de analito como branco de soro ($n=6$), com amostras fortificadas.

Amostras branco de solvente (H_2O + ácido fórmico 0,1%, v/v) foram analisadas após os CQAs (931.0 ng mL^{-1}) e entre as análises dos padrões de calibração mais alto, com concentração de 1241 ng mL^{-1} , para verificar efeito de *carryover*.

A linearidade foi avaliada usando 11 níveis de concentração dos padrões de calibração para cada prostaglandina ($n=3$). A curva para cada prostaglandina foi construída por regressão linear usando a razão da área PG/PI *versus* a concentração nominal das prostaglandinas.

Exatidão e precisão intra ($n=5$) e inter ($n=15$) lotes foram avaliadas usando as amostras de CQ ($31,034$, $517,24$ e $931,03 \text{ ng mL}^{-1}$).

O limite inferior de detecção (LOD) foi definido como a concentração mais baixa encontrada para a razão sinal/ruído de pelo menos 3x. Enquanto que o limite inferior de quantificação (LOQ) foi determinado como a concentração do padrão de calibração mais baixa, com exatidão e precisão de $\leq 20\%$ ($n=3$).

O efeito de matriz foi avaliado para o procedimento *on-line* usando amostras de soro de diferentes voluntárias ($n=6$), fortificadas nas concentrações nos níveis do CQ baixo e CQ alto ($31,03$ e $931,0 \text{ ng mL}^{-1}$) e o *RSD* foi calculado para as concentrações encontradas.

A eficiência de processo foi calculada comparando as razões das áreas das bandas cromatográficas dos CQs (baixo e alto) em soro com amostras nas mesmas concentrações preparadas em água ultrapura.

A estabilidade foi avaliada comparando as razões das áreas de amostras CQB e CQA mantidas no auto-injetor por 24 e 48 horas com aquelas recém preparadas. $\text{RSD} \leq 15\%$ foi o critério de garantia de estabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O preparo de amostra on-line proporciona inúmeras vantagens para análise de amostra biológica, principalmente pela redução de tempo de preparo, devido a automatização do sistema, além de análises com boa reprodutibilidade, redução de volumes de amostra e solvente, reduzindo os riscos de contaminação, bem como diminuição de perda do analito, devido a menor manipulação da amostra.

O desenvolvimento do método por *SPE on-line* para a quantificação das PGs no soro demandou a avaliação de alguns parâmetros, a fim de garantir a validade das análises de acordo com uma melhor configuração do sistema.

4.1 IONIZAÇÃO DAS PROSTAGLANDINAS E PADRÃO INTERNO

As condições de ionização e fragmentação das PGs e do PI foram otimizadas manualmente por infusão direta de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada solução individual ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$, 50:50 + ácido fórmico 0,1%, v/v) com vazão pela bomba seringa combinada com a fase móvel vinda do LC ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$, 55:45 + ácido fórmico 0,1%, v/v), vazão de $50 \mu\text{L mL}^{-1}$.

A fim de obter uma melhor ionização dos analitos observou-se que na infusão direta a intensidade aumentava quando em solução de água acidificada e adição de ACN. Além do que, pelo modo combinado é possível observar também a influência da fase móvel do LC na ionização. Ambos os modos de ionização positivo e negativo foram avaliados, contudo os analitos apresentaram melhor estabilidade e intensidade no modo negativo.

Os parâmetros otimizados para este método bem como as condições de ionização e fragmentação para cada analito estão dispostas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições otimizadas para ionização e fragmentação das PGs.

Analito	Íon precursor (M-H) ⁻ (m/z)	Íons produtos (m/z)	Transição de quantificação	Energia cone (V)	Energia colisão (eV)
PGE ₂	351.0	351 → 315 351 → 271	351 → 315	20.0 20.0	15.0 25.0
PGE ₂ -d4	355.2	355 → 319 355 → 275 355 → 193	355 → 319	20.0 20.0	12.0 18.0
PGF _{2α}	353.0	353 → 309 353 → 193	353 → 193	35.0 35.0	30.0 25.0

4.2 PREPARO DE AMOSTRA

O fluido menstrual é uma matriz complexa devido a sua viscosidade e heterogeneidade na sua composição, a qual é composta por sangue, coágulos, secreção vaginal, células mortas do tecido endometrial, entre outros componentes (YANG et al., 2012).

O processo de obtenção da matriz foi bastante complicado, devido a fatores como: disponibilidade de voluntárias para realizar o estudo e frequente desistência das mesmas. procedimento de coleta, o qual envolveu a adaptação ao uso do coletor menstrual. coleta mensal, o que levou muito tempo para obtenção das amostras. entre outros.

A presença de coágulos e tecido é um grande problema para o preparo de amostra, devido a viscosidade e heterogeneidade da matriz, além do alto conteúdo de proteínas e outras substâncias endógenas que interferem no efeito de matriz, tornando este tipo de análise um desafio analítico muito grande.

Sendo assim, para alcançar as condições de desenvolvimento e validação do método, o uso de uma matriz substituta, ou *surrogate*, foi utilizada para viabilizar o trabalho. *Surrogate* se caracteriza por ser uma matriz sintética ou biológica similar àquela de interesse e sem a presença do analito alvo, e que represente as características da matriz original. Esse procedimento envolve a incorporação de um padrão interno estável, com marcação isotópica, adicionado à matriz substituta, a qual

é usada para o preparo das soluções de calibração e controles de qualidade (JONES et al., 2012. (KORECKA et al., 2014).

Nesse trabalho foi utilizado soro periférico de voluntárias como *surrogate* e, em seguida, o método desenvolvido e validado foi aplicado às amostras de fluido menstrual. As amostras de calibração foram preparadas frescas no dia da análise usando a mistura de soro diluído como *surrogate*. Para garantir que o soro periférico não apresentasse a presença de níveis detectáveis de prostaglandinas, este foi coletado fora do período menstrual das voluntárias e cada amostra foi injetada no sistema SPE-LC-MS/MS antes de preparar a mistura.

A mistura de soro foi realizada a fim de se obter uma matriz complexa que representasse o maior número de amostras possível. Uma vez que o teor de PGs e metabólitos em geral, varia muito entre uma voluntária e outra, de acordo com cada processo fisiológico individual.

Além disso, para garantir a homogeneidade da amostra e remover coágulos e detritos celulares no fluido menstrual, as amostras foram diluídas (1:1) na solução do padrão interno (PI), cada solução de trabalho de PGs foi adicionada para garantir a concentração final desejada e então a amostra foi misturada em vórtex (10s) e centrifugada (1,5 x g, 10 min, 4°C). Esse procedimento resultou em um pequeno precipitado no fundo do tubo de eppendorf, logo, disso 200 µL do sobrenadante foi pipetado e injetado no sistema SPE-LC-MS/MS para ser analisado.

4.3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO POR SPE *ONLINE* E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

O procedimento de preparo de amostra ou limpeza é um processo muito importante para melhorar os critérios analíticos, possibilitando precisão e exatidão, além de evitar efeito de matriz pela remoção de substâncias interferentes e proporcionar o enriquecimento dos analitos de interesse.

A fim de analisar substâncias de baixa concentração em um volume de amostra pequeno e visando obter procedimento de análise cada vez mais sustentáveis, o método foi desenvolvido utilizando sistema de preparo de amostra *on-line* acoplado à LC-MS/MS, o qual tem sido utilizado com êxito para análises de matrizes biológicas (LI. RIVORY. CLARKE, 2006. XU et al., 2007).

Essa técnica possibilita também análises mais reprodutíveis, devido a automatização do sistema, abordagem sustentável ou *green*, além de reduzir muito o tempo de análise e etapas longas e exaustivas quando comparada a procedimentos de preparo de amostra convencionais.

Para a otimização do método de *SPE on-line* as condições avaliadas foram: retenção dos analitos na coluna, fase móvel de extração, vazão e tempo de transferência para a segunda dimensão, coluna analítica.

A escolha pela fase estacionária da coluna se deu devido à grande abrangência de metabólitos desta fase polimérica, além do fato de suportar variações de pH e ter sido bastante relatada na literatura recentemente para análises de diversas classes de substâncias, dentre elas eicosanoides, incluindo PGE₂ e PGF_{2α}, em matrizes biológicas como soro e plasma humano. Alguns desses exemplos podem ser observados na Tabela 1 (Introdução).

Entretanto, nos trabalhos encontrados na literatura que utilizaram SPE como preparo de amostra são, em sua grande maioria, procedimentos realizados da forma *off-line*. O processo *on-line* ainda é uma metodologia em desenvolvimento, devido aos desafios analíticos que apresenta.

Para o desenvolvimento do método, as condições cromatográficas foram avaliadas individualmente para o cartucho de *SPE* e para a coluna analítica, e depois adaptadas para o sistema, acoplando ambas sequencialmente.

Para otimização da melhor fase móvel para limpeza, eluição das PGs e separação analítica, foram avaliadas para fase aquosa, as seguintes soluções: tampão formiato e acetato de amônio (pH = 6,8 e 2,8, respectivamente), H₂O e H₂O (0,1% ácido fórmico, v/v, pH = 2,8). Essas combinações foram definidas tendo como base métodos descritos na literatura para análise de eicosanoides em matrizes biológicas (BROSE. BAKER. GOLOVKO, 2013. CAO et al., 2008. ARAUJO et al., 2014. SUROWIEC et al., 2011).

Entretanto, observou-se, ao comparar as fases móveis acima, que houve supressão da ionização dos analitos quando utilizado os tampões. Sendo assim, optou-se por trabalhar com H₂O (0,1% ácido fórmico, v/v, pH = 2,8) devido a melhor ionização da amostra. Neste pH ambos os analitos encontram-se na forma protonada, uma vez que, o pKa das PGs é em torno de 4,75 (pH +/- 1,5 unidades de pKa). E a fase orgânica utilizada foi acetonitrila (0,1% ácido fórmico, v/v).

Para otimização da fase móvel, retenção das PGs e tempo de transferência, essas foram testadas em uma alta concentração ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), a fim de garantir que qualquer concentração encontrada nas amostras reais estivesse dentro das condições otimizadas. Inicialmente, as PGs foram preparadas em solução (H_2O , 0,1% ácido fórmico, v/v) e, em seguida, foram testadas na matriz, a fim de verificar a reprodutibilidade. A confirmação foi feita fortificando ambos, solução e soro periférico, na mesma concentração de PGs ($2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

A fase móvel de transferência dos analitos da fase extratora para a coluna analítica foi definida como ACN: H_2O (40:60, 0,1% ácido fórmico, v/v). As condições cromatográficas otimizadas e a sequência dos eventos para o procedimento de SPE *on-line* estão descritas na Tabela 3 (Figura 8).

Tabela 3. Método otimizado para procedimento de SPE *on-line*, coluna OASIS HLB.

Tempo (min)	A	B	C	D	Eventos	Válvula QSM	
0,00 – 3,00	100				Injeção e limpeza da amostra	Lixo	1
3,01 – 6,00	60	40			4,2 – 4,9 min: transferência dos analitos	Eluição das PGs para coluna analítica	2
6,01 – 10,00		15	50	35	Limpeza HLB	Lixo	1
10,01 – 15,00	100				Condicionamento HLB	Lixo	1

A: H_2O (0,1% ácido fórmico) - B: ACN (0,1% ácido fórmico) - C: H_2O - D: Isopropanol

O sistema foi configurado especialmente para o procedimento de extração *on-line*, utilizando para isso, um *loop* de 10 μL de volume para comutação automatizada das colunas, e uma válvula de seis entradas para injeção e outra para o acoplamento entre as colunas (Figura 8).

As amostras foram inicialmente injetadas (10 μL) no cartucho OASIS HLB (2,1 x 20 mm, 25 μm) usando como fase móvel H_2O (ácido fórmico 0,1%, v/v). Simultaneamente a coluna analítica, XSelect HSST3 (2,1 x 100 mm, 3,5 μm), foi condicionada com a fase móvel H_2O :ACN (55:45, ácido fórmico 0,1%, v/v).

A limpeza da amostra e retenção dos analitos de interesse foi realizada nos primeiros 3 minutos. A partir disso, iniciou-se o processo de eluição das PGs, de 3,01

a 6,00 minutos com H₂O:ACN (60:40, ácido fórmico 0,1%, v/v). A banda cromatográfica dos analitos aparece no intervalo de 4,2 – 4,9 minutos (Figura 7), sendo assim, o tempo de acoplamento entre as válvulas foi de 42 segundos. Após determinado o tempo de transferência, a válvula troca de posição (posição 2), direcionando a vazão para a coluna analítica e a fração com as PGs é então transferida, durante os 42 segundos.

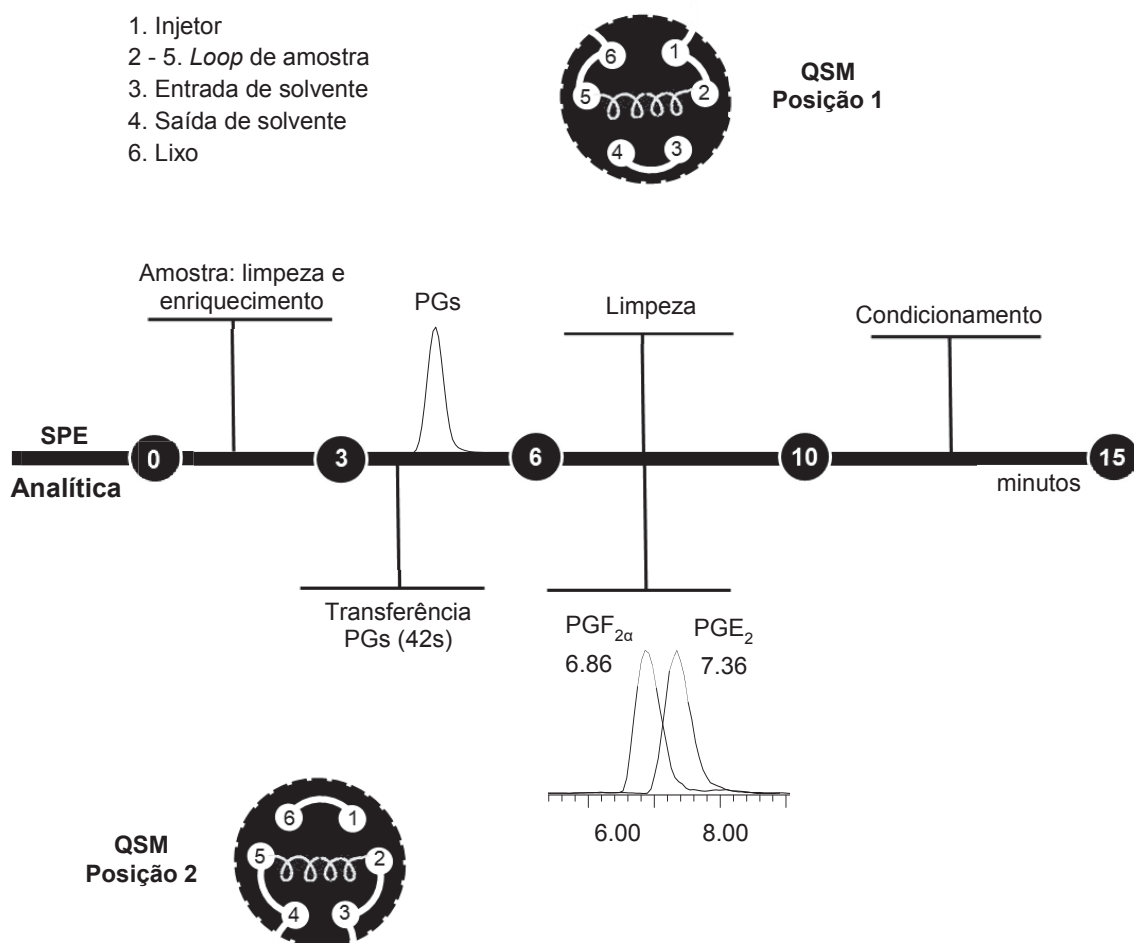


Figura 7. Sequência de eventos para o sistema *on-line* SPE-LC-MS/MS.

O tempo de acoplamento entre ambas as colunas foi avaliado com injeções de 10 – 50 µL de soro periférico e menstrual, ambos fortificados com os padrões (CQB – 15 ng mL⁻¹), a fim de observar se o volume de amostra causaria mudanças no tempo de retenção dos analitos.

Para evitar que substâncias indesejadas ficassem retidas no cartucho de SPE, posterior a transferência da fração das PGs, a válvula de seis caminhos retorna à posição inicial (posição 1), para limpeza (H₂O:ISO:ACN 55:35:15 + ácido fórmico 0,1%, v/v), durante 5 minutos, entre cada injeção. Em seguida, é realizado o

condicionamento do mesmo para a próxima injeção, enquanto as PGs são analisadas na coluna analítica.

Ajustes na proporção da fase móvel e fluxo na coluna analítica foram avaliadas para que houvesse resolução mínima entre as bandas de cada PG, o método otimizado foi isocrático H₂O:ACN (55:45, ácido fórmico 0,1%, v/v) e vazão de 250 µL min⁻¹. Enquanto que na primeira dimensão, a vazão foi otimizada para obter retenção suficiente e menor tempo de transferência possível, a vazão na coluna de SPE foi de 500 µL min⁻¹. O tempo total de análise foi de 15 minutos e o tempo de acoplamento das válvulas, para transferência da fração de PGs foi de apenas 42 segundos.

A escolha da coluna XSelect HSST3 C18 para a separação analítica foi devido a revisão bibliográfica realizada com foco em análises para quantificação de eicosanoides em matrizes biológicas (BROSE. BAKER. GOLOVKO, 2013. PUPPOLO. VARMA. JANSEN, 2014). Esse tipo de fase estacionária apresenta partículas de sílica carregadas, proporcionando seletividade para todas as classes de metabólitos: ácidos, alcalinos e neutros. Além de melhorar a simetria de banda, aumentar a retenção de compostos polares, fornece rápido equilíbrio da coluna após alteração da fase móvel e estabilidade a pH baixo (faixa de pH: 2 – 8). Uma vez testada para o presente trabalho, demonstrou ser adequada e apresentou bom desempenho quanto a resolução e seletividade para os analitos.

4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A calibração univariada é muito empregada na química analítica quantitativa instrumental, dentre os principais métodos são a calibração por padrão externo, a calibração por adição de padrão e a calibração por padronização interna, métodos esses que serão objeto de detalhamento neste trabalho.

O método de calibração escolhido para este trabalho foi calibração por padronização interna. Padrão interno (PI) é um composto com características químicas, de resolução e retenção semelhantes a do analito de interesse, devendo apresentar alta pureza e estabilidade (SKOOG et al., 2006). Este método é ideal para amostras que necessitam de processo de manipulação extensivo. O PI serve para corrigir perdas da amostra durante o tratamento, corrigir variabilidade no sinal na detecção por espectrometria de massas, uma vez que o grau de supressão ou aumento de ionização varia a medida que as análises vão sendo adquiridas no

equipamento. Logo, os valores obtidos podem variar de um lote para outro. entretanto o uso do padrão interno permite corrigir essas alterações, pois a razão entre a área de pico para PI e analito permanece a mesma entre as injeções.

A escolha da estratégia de validação é específica para cada análise, não existe um protocolo geral e limitado, os parâmetros analisados devem cumprir as necessidades e interesses do objetivo de cada trabalho.

O método desenvolvido foi validado de acordo com os critérios estabelecidos e aceitos internacionalmente, considerando como figuras de mérito: seletividade, efeito de matriz, LOQ e LOD, linearidade, precisão, exatidão e recuperação.

4.4.1 Efeitos avaliados para etapa de diluição da amostra

Para a etapa de diluição do soro na solução de padrão interno os parâmetros de efeito de matriz (EM), recuperação (RE) e eficiência de extração (EE) foram avaliados de acordo com o método proposto por TRUFELLI et al., 2010. Para isso, três conjuntos de amostras da mistura de soro periférico foram analisados usando as concentrações no nível CQB ($31,03 \text{ ng mL}^{-1}$), em triplicata (Figura 8).

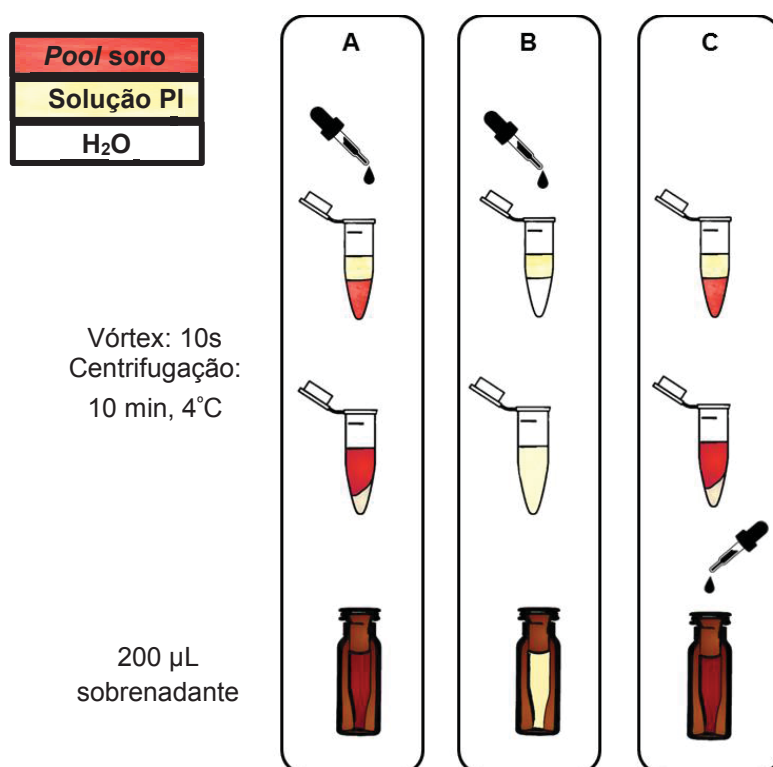


Figura 8. Esquema representativo dos três conjuntos (A, B e C) das amostras para calcular EM, RE e EE. Adaptado de TRUFELLI et al., 2010.

A: o fluido biológico é fortificado antes do preparo de amostra.

B: solução de trabalho preparada em H₂O (0,1% ácido fórmico) e fortificada antes do preparo.

C: o fluido biológico é fortificado após o preparo de amostra, ou seja, os analitos foram adicionados diretamente ao sobrenadante.

Após diluição (1:1) do soro na solução de padrão interno, as amostras foram agitadas em vórtex (10s) e centrifugadas (1,5 x g, 10min, 4°C). Dessa solução, 200 µL do sobrenadante foram injetados no sistema SPE-LC-MS. Os cálculos realizados para cada efeito foram:

$$\text{EM} = \text{Area (C/B)} \times 100$$

$$\text{RE} = \text{Area (A/C)} \times 100$$

$$\text{EE} = (\text{A/B}) \times 100$$

Para escolha do melhor solvente para diluição da amostra foram avaliadas as seguintes misturas: ACN (50%), MeOH (50%) ambos em H₂O (0,1% ácido fórmico) e H₂O (6% ácido fórmico) (Tabela 4). Os parâmetros usados para análise foram o volume de precipitado no fundo do frasco e turbidez do sobrenadante (qualitativo) e integração da área da banda cromatográfica (quantitativo) de cada grupo de amostra (n=3).

Tabela 4. Efeito de Matriz (EM), Recuperação (RE) e Eficiência de Extração (EE) para etapa de diluição da amostra.

Solvente	PGF _{2α}			PGE ₂		
	EM	RE %	EE	EM	RE %	EE
H ₂ O (6%)	87	112	97	87	113	98
ACN (50%)	80	120	96	87	122	106
MeOH (50%)	89	119	106	92	126	116
MeOH (25%)	84	120	101	86	119	102
MeOH (10%)	88	98	87	101	118	120

MeOH: metanol. ACN: acetonitrila.

Os resultados para as três primeiras soluções de solventes foram semelhantes. Entretanto, observou-se maior precipitado para ACN (50%) e MeOH (50%). Outro aspecto observado foi que após 24 horas de preparo, o sobrenadante da amostra preparada em MeOH (50%) apresentava-se límpido, enquanto que aqueles do preparo em ACN (50%) apresentaram turbidez. Sendo assim o MeOH foi selecionado como melhor solvente e este foi testado em outras duas concentrações mais baixas: MeOH (25%) e MeOH (10%) (Tabela 4).

A redução do uso de solventes orgânicos é sempre a melhor escolha para desenvolvimento de métodos sustentáveis, para isso, o MeOH (10%) foi selecionado, uma vez que apresentou melhor EE para ambas as PGs, sendo cerca de 90%. Essa solução foi usada para preparar o Padrão Interno e o soro foi diluído 1:1 na mesma, logo, a concentração final da amostra foi de menos de 5% de MeOH.

Avaliando o efeito de matriz observou-se leve supressão de sinal para $\text{PGF}_{2\alpha}$ (88%) e recuperação em torno de 100%. Enquanto que PGE_2 não apresentou EM e teve RE em torno de 120%.

Em estudo realizado por (DEEMS et al., 2007), para quantificação de PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$ de meio de cultura celular, obteve-se recuperação entre 25 e 75%, usando SPE *off-line* para extração dos analitos. Em outro trabalho, foi encontrado recuperação entre 95 a 105% para extração líquido-líquido de PGE_2 em plasma humano (ARAUJO et al., 2014).

Fosfolipídeos são interferentes frequentes em matrizes biológicas, como o soro, pois são componentes da membrana celular, além de serem os precursores do ácido araquidônico, a partir do qual são sintetizadas as prostaglandinas (ISMAIEL et al., 2007). Para a identificação desses compostos foi realizado o experimento de *full scan* com elevada energia de cone (90 eV), para que a fragmentação ocorresse ainda na fonte de ionização, possibilitando assim, a observação do íon m/z 184 característico da fragmentação de fosfolipídeos. Esse fragmento foi encontrado no espectro de massas extraído antes da otimização do solvente de diluição (ANEXO 2). Contudo, após a otimização dos parâmetros de extração, esse não foi mais observado, uma vez que a seletividade do método também foi confirmada.

4.4.2 Eficiência de processo para extração *on-line*

Para o procedimento *on-line*, ou seja, global, foi avaliado o efeito de matriz, conforme disposto na normativa da EMA de 2011, sendo esse o único guia de

validação que abrange procedimentos *on-line*. Para isso, seis amostras de soro periférico, sem a presença de analito, de voluntárias diferentes, foram preparadas e fortificadas com os CQ baixo e alto, e o RSD entre as amostras foi calculado. Os valores foram de 12 e 14% para $\text{PGF}_{2\alpha}$ e 7,0 e 2,0% para PGE_2 (CQB e CQA, respectivamente). Valores aceitos dentro do limite de até 15%.

A eficiência do processo foi calculada comparando as amostras preparadas na matriz com aquelas preparadas em H_2O , obtendo resultados em torno de 100% para cada PG (Tabela 7).

A estabilidade das amostras fortificadas em CQB (31,03 ng mL^{-1}) e CQA (931,0 ng mL^{-1}) foram avaliadas frescas e por 24h e 48h, à 4°C, temperatura do auto-injetor e as amostras mostraram-se estáveis nestas condições, com RSD inferior à 15%, conforme pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Estabilidade para PGs. CQB: 31,03 ng mL^{-1} e CQA: 931,0 ng mL^{-1} .

	ESTABILIDADE (RSD)					
	Amostra fresca		24h		48h	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
$\text{PGF}_{2\alpha}$	2,6	4,3	8,4	6,0	12	15
PGE_2	4,7	2,3	2,5	4,0	7,0	1,0

RSD: desvio padrão relativo.

Além disso, amostras de solvente (branco), injetadas entre as curvas de calibração e após os CQ altos dos lotes de controles garantiram que não houve efeito de *carryover*.

A seletividade avaliada para diferentes amostras (n=6) de soro, sem a presença de analito, quando comparadas com as amostras fortificadas, mostrou a ausência de coeluição de outros metabólitos, significando, assim, que o método foi seletivo para as prostaglandinas (ANEXO 3).

4.4.2 Linearidade, exatidão, precisão, LOQ e LOD

As curvas de calibração para ambas PGs foram construídas considerando 8 soluções de calibração, o que está de acordo com o guia de validação, o qual sugere no mínimo 6 concentrações. Ambas as curvas foram lineares, usando o método de Mínimos Quadrados Ordinários, na faixa de concentração estudada, sendo a média de coeficiente determinado (R^2) ($n = 3$) maior que 0,999 (Figura 9).

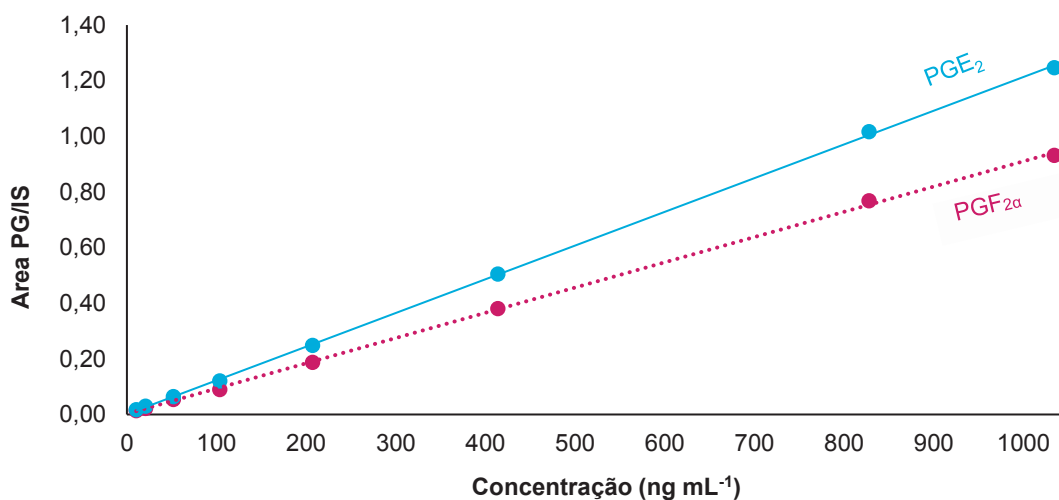


Figura 9. Curva de calibração preparada em soro periférico para PGE₂ e PGF_{2α}. Faixa de concentração de 10,3 – 1.035 ng mL⁻¹.

Precisão e exatidão para cada concentração da curva foi obtida dentro dos critérios aceitos: $RSD \leq 15\%$ e exatidão $\pm 15\%$, respectivamente. Exceto para a concentração mais baixa (LOQ), para a qual o limite aceito é de até 20%. Os valores obtidos para precisão, exatidão, limites de quantificação e detecção, bem como os parâmetros de linearidade para cada PG estão listados na Tabela 6.

Tabela 6. Linearidade, limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), valores de teste de Cochran's.

Analitos	Linearidade (ng mL ⁻¹)	Equação da reta	R ²	Cc	Ct	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)
PGF _{2α}	10,3 – 1.035	$y = 0,0009x + 0,0026$	0,9996	0,451	0,506	6,8	10,3
PGE ₂		$y = 0,0012x + 0,0015$	0,9998	0,475		7,3	

Valores de teste de Cochran's: Cc (valor de C calculado) e Ct (valor de C tabelado).

O limite inferior de quantificação (LOQ) foi de $10,3 \text{ ng mL}^{-1}$, considerando a concentração mais baixa das soluções de calibração. E o limite inferior de detecção (LOD) foi a menor concentração encontrada com razão de sinal/ruído (S/R) maior que 3. Os valores obtidos foram $6,8 \text{ ng mL}^{-1}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) e $7,3 \text{ ng mL}^{-1}$ (PGE_2).

A precisão e exatidão intra- ($n=5$) e inter-lote ($n=15$) foram obtidas avaliando três soluções de controle de qualidade (CQs), nas concentrações baixa, média e alta (CQB, CQM, CQA, respectivamente) em quintuplicata e três diferentes lotes. Cada lote foi avaliado em dias diferentes: lote 1 (1º dia), lote 2 (2º dia) e lote 3 (3º dia). A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (RSD) entre as medidas das replicatas e a exatidão como porcentagem entre as concentrações calculada e nominal. Levando em consideração que 75% das amostras devem apresentar RSD $\leq 15\%$ os valores calculados apresentaram-se exatos e precisos, conforme listados na Tabela 7.

Realizando o teste de Cochran's, o qual compara a homogeneidade da variância das amostras dos níveis de concentração calculados, os dados se caracterizaram como homoscedásticos, ou seja, o valor de C calculado (C_c) foi menor que C tabelado (C_t), $C_c < C_t$ (Tabela 6). Juntamente com os gráficos de resíduos construídos para regressão linear (ANEXO 4), é possível concluir que esses não seguem nenhuma tendência, significando que se distribuem aleatoriamente.

Tabela 7. Exatidão, precisão intra- e inter-lote, efeito de matriz (EM) e eficiência de processo (EP) para CQB: 31,03. CQM: 517,2 e CQA: 931,0 (ng mL⁻¹).

Análito	Concentração (ng mL ⁻¹)	Lote 1 (n = 5)			Lote 2 (n = 5)			Lote 3 (n = 5)			Inter-lote (n=15)	EM (n=6)	EP (n=5)
		Exatidão	Precisão	Exatidão	Exatidão	Precisão	Exatidão	Exatidão	Precisão	Exatidão	Precisão	DPR	± 15%
PGF _{2α}	31,0	87	3,1	91	91	6,7	91	91	7,1	89	6,3	12	112
	517	90	4,4	96	96	4,9	90	90	2,5	90	4,5		
	931	97	3,0	104	104	2,7	99	99	8,2	101	5,4	14	107
PGE ₂	31,0	106	5,8	108	108	8,9	103	103	5,3	106	6,6	7,1	103
	517	99	6,2	108	108	2,3	106	106	1,7	105	5,2		
	931	103	2,8	107	107	3,7	111	111	4,0	108	3,8	2,0	102

4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO ÀS AMOSTRAS DE FLUIDO MENSTRUAL

O método validado foi usado para analisar os dois grupos de amostras de fluido menstrual: Grupo Controle (GC) e Grupo Tratado com suco de limão Tahiti (GT).

No total, considerando todas as amostras sem tratamento, foram avaliadas 15 amostras controles e 7 tratadas com limão. As coletas foram realizadas no segundo dia da menstruação devido ao fato de ter sido sugerido que a produção de prostaglandinas seria mais elevada nos dois primeiros dias da menstruação (JOHNSON, 2006).

As amostras foram coletadas por 2 meses consecutivos para o GC, resultando em amostras GC₁ e GC₂ (mês 1 e mês 2, consecutivamente). Para o GT, foram coletados por 3 meses consecutivos, sendo o primeiro mês o controle da própria voluntária, resultando, então em GT₀, GT₁ e GT₂ (sem tratamento, tratamento mês 1 e mês 2, consecutivamente). Considerando que as voluntárias do GC não eram as mesmas do GT. As PGs foram quantificadas e os dados da concentração média de cada grupo estão apresentados nos gráficos a seguir.

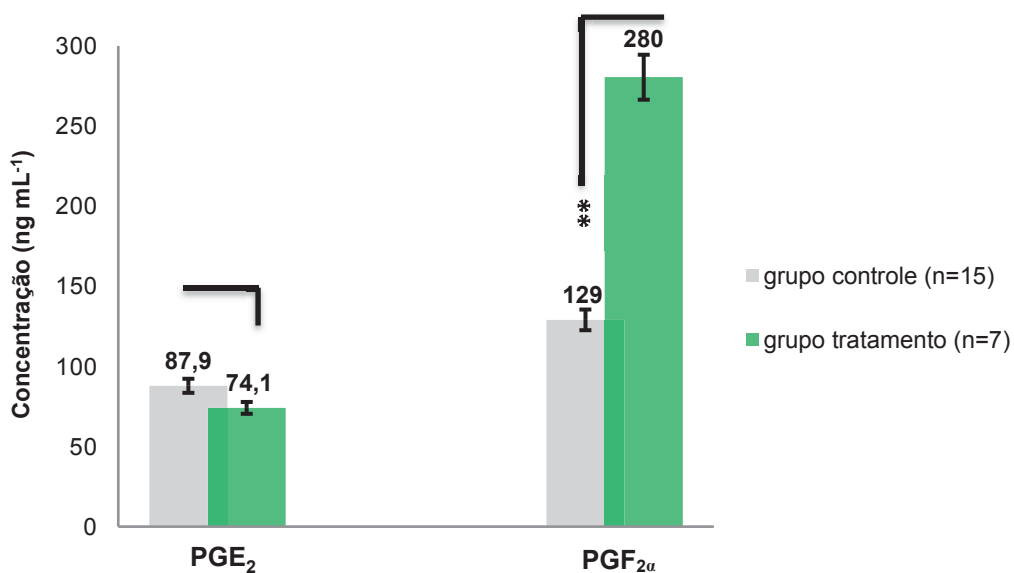


Figura 10. Gráfico da concentração média de PGE₂ e PGF_{2α} para os grupos controle e tratado. Barra de erro em porcentagem. *PGE₂ p-valor (P>0.05) e **PGF_{2α} (P<0.05) significante.

Avaliando as concentrações de PGs encontradas entre as replicatas biológicas de cada grupo estudado, não foi possível observar um padrão único para todas as amostras. Entretanto, ao avaliar a média das concentrações para cada grupo, observa-se um aumento nos níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ do grupo GC (129 ng mL^{-1}) para o grupo GT ($280,5 \text{ ng mL}^{-1}$). Enquanto que para PGE_2 nota-se uma leve diminuição na faixa de concentração do GT ($74,1 \text{ ng mL}^{-1}$) para o GC ($87,9 \text{ ng mL}^{-1}$) (Figura 10).

A variação encontrada entre as coletas para a mesma voluntária pode ser explicada devido à grande variabilidade inter-individual, uma vez que, cada organismo apresenta características únicas de metabolismo. Para confirmar esses resultados prévios aqui obtidos para o padrão nos níveis de prostaglandinas um número maior de amostras deve ser analisado, para que se tenha confiabilidade nessa variação.

5 CONCLUSÃO

O sistema *on-line* SPE–LC–MS/MS se mostrou uma ótima escolha para análise de prostaglandinas em fluido menstrual. O preparo de amostra *on-line* com baixo consumo de solventes orgânicos forneceu um preparo de amostra rápido, sustentável e reproduzível para a quantificação de PGs.

O método foi validado de acordo com o guia de validação da EMA, avaliando como figuras de mérito efeito de matriz, recuperação, estabilidade, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação.

Além disso, o tempo total de análise foi de apenas 15 minutos, com tempo de acoplamento entre as válvulas de 42 segundos, com baixo consumo de solvente, aproximadamente 12 mL por corrida, considerando nisso, o passo de diluição da amostra.

A coluna OASIS HLB utilizada para a extração *on-line*, demonstrou boa retenção dos analitos durante a limpeza de interferentes endógenos.

Por fim, o método desenvolvido usando soro periférico como *surrogate*, foi validado com sucesso e aplicado em amostras de fluido menstrual para quantificação de PGE₂ e PGF_{2α}. Avaliando a faixa de concentração obtida para os grupos analisados, observa-se, para o grupo GT um aumento nos níveis de PGF_{2α} e diminuição nos níveis de PGE₂.

CAPÍTULO II

ANÁLISE DE METABÓLITOS SECUNDARIOS DO SUCO DE LIMÃO TAHITI (*Citrus latifolia*) POR LC-DAD E LC-MS/MS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA FRENTE À CICLO-OXIGENASES 1 E 2.

1 INTRODUÇÃO

1.1 GÊNERO *CITRUS* – FAMÍLIA RUTACEAE

A família de plantas Rutaceae (ordem Sapindales) caracteriza-se pela ampla diversidade de metabólitos secundários produzidos, os quais variam de cumarinas, flavonoides e limonoides, até alcaloides antranílicos.

Citrus é o gênero mais importante do ponto de vista econômico pertencente à família Rutaceae. Frutas cítricas são amplamente consumidas mundialmente, sendo o Brasil o maior produtor mundial de suco laranja, representando 3/4 da produção total (USDA, 2018).

Laranja, limão, mandarina, tangerina e toranja, são ricos em metabólitos fenólicos, principalmente flavonoides (LIN et al., 2011. KHAN et al., 2014).

Frutos de citros apresentam diferentes perfis de flavonoides, bem como diferente concentração, sendo as flavanonas, flavonas e flavonóis as principais classes (Figura 11).

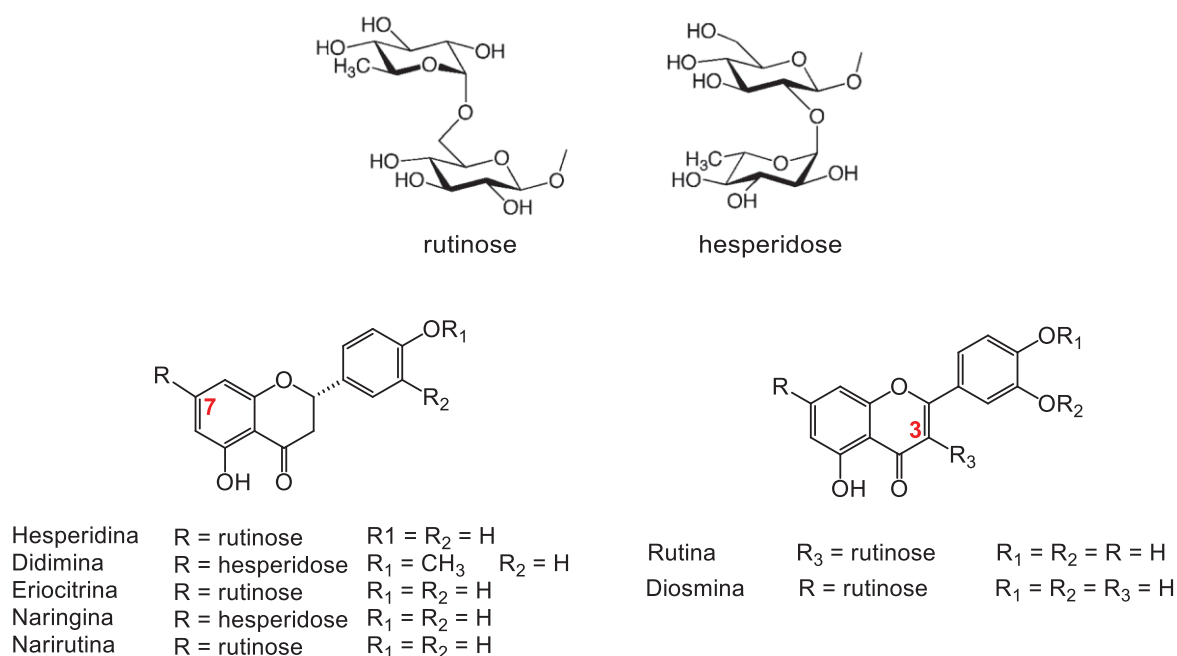


Figura 11. Principais flavonoides glicosilados encontrados em suco de *Citrus*.

Flavanonas geralmente são encontradas na forma glicosilada, sendo 7-O-glicosídeo a forma mais abundante. Essa classe é responsável pelo sabor típico de citros. Em limão e lima, as unidades de rutinoses, como hesperidina, narirutina e

didimina, são majoritárias e consideradas sem gosto. enquanto que em toranja predominam neohesperidoses, como naringina, neohesperidina e neoeriocitrina, aos quais é atribuído o gosto amargo (PETERSON et al., 2006. PETERSON et al., 2006b. KHAN et al., 2014). A maior concentração de flavanonas ocorre no flavedo, quando comparado ao albedo (NOGATA et al., 2006).

Flavonas são geralmente encontradas no flavedo e suco dos frutos. São bastante comuns flavonas polimetoxiladas. Suco de limão também apresenta diosmina e, em menor quantidade, flavonas C-glicosiladas (GATTUSO et al., 2007. KHAN et al., 2014).

O flavedo é rico em flavonoides glicosilados, enquanto que nas sementes se encontra menor quantidade, sendo eriocitrina majoritára nas sementes de limão, juntamente com limonoides. Flavonóis como kampferol, mirecetina, quercetina, são bastante comuns em frutos de citros (KE et al., 2015).

Toranja ou *grapefruit* caracteriza-se principalmente pela presença de naringina e narirutina, flavanonas glicosiladas. Laranja doce apresenta hesperidina e narirutina, enquanto que laranja amarga diferencia-se por apresentar naringina e neohesperidina. Em limas destaca-se apenas hesperidina, enquanto que frutos de limões mostram maior concentração de hesperidina e eriocitrina, (15,8 e 9,5 mg /100g de fruta ou suco), respectivamente (CARISTI et al., 2003. KHAN et al., 2014. (PETERSON et al., 2006).

Outra classe de flavonoides, também encontrada em citros, embora em menor abundância, são as antocianinas, glicosídeos de antocianidinas. Uma vez que essas estão associadas a pigmentos, elas são encontradas em laranjas vermelhas ou laranja-de-sangue (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), tanto no flavedo e albedo, como no suco (HILLEBRAND. SCHWARZ. WINTERHALTER, 2004. KELEBEK. CANBAS. SELLI, 2008).

Nas folhas também são encontradas flavanonas glicosiladas e tem sido sugerido que sejam sintetizadas principalmente em folhas e frutas jovens em rápido crescimento. Enquanto que nas raízes em geral, são caracterizadas quase que exclusivamente pela presença de cumarinas.

Em trabalho realizado por CERQUEIRA, 2016 (tese de doutorado), uma revisão bibliográfica de metabólitos do gênero *Citrus* catalogou 630 substâncias já relatadas de diferentes classes metabólicas, conforme mostrado na Tabela 8.

Tabela 8. Substâncias catalogadas para o gênero *Citrus* (Cerqueira, 2016).

Classe	Subclasse	Número de substâncias
Terpenoides	Triterpenos. esteroides. limonoides. carotenoides. sesquiterpenos	153
Cumarinas	Furano e pirano cumarinas (lineares e angulares). bicumarinas	139
Flavonoides	Favanol. favanona. flavona. antocianina. isoflavonoide (glicona e aglicona)	191
Alcaloides	Alcaloides quinolínicos, ciclopéptídicos e ligados a núcleos cumarínicos	83
Outros	Derivados fenólicos. aminas. amidas	64

A experiência que o Grupo de Produtos Naturais da UFSCar tem em relação aos estudos fitoquímicos de espécies da família Rutaceae, em especial o gênero *Citrus* permite prever uma ocorrência maior de cumarinas nas raízes, flavonoides nas folhas, limonoides nas sementes e flavonoides glicosilados nos frutos das espécies desse gênero. Essa distribuição é representada de forma geral na Figura 12.

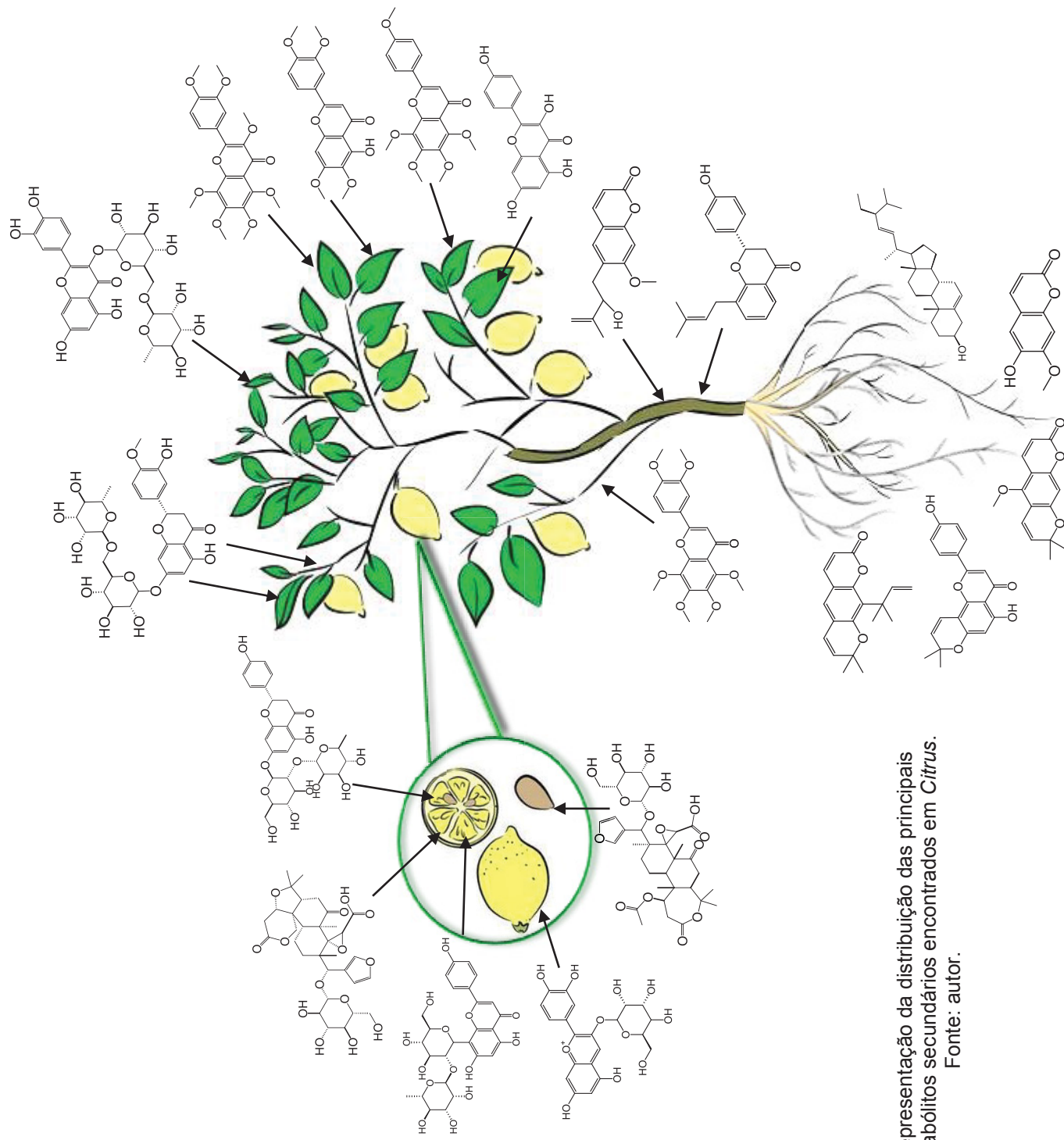


Figura 12. Representação da distribuição das principais classes de metabólitos secundários encontrados em *Citrus*.
Fonte: autor.

1.2 CITROTERAPIA NO CONTROLE DO FLUXO MENSTRUAL

Extrato e suco de *Citrus aurantium*, também conhecido como laranja amarga, são citados na medicina chinesa tradicional no controle do sangramento menstrual excessivo. Contudo, a maioria das citações são patentes escritas em chinês, e somente resumos em inglês foram possíveis de se obter utilizando o Scifinder. Tem-se utilizado uma mistura de *C. aurantium* e extratos de várias plantas, sendo difícil avaliar qual classe de substância de *Citrus* seria responsável pela atividade (JP 1966-323251, CA 2009:1471033. CN 2011-10423910, CA 2012:1029275). Estudos científicos mais claros referem-se ao uso de *C. aurantium* na perda de peso, cujos princípios ativos são os derivados da amina sinefrina (STOHS. PREUSS. SHARA, 2012).

Informações no Brasil sobre o uso do limão Tahiti ou limão da Pérsia (*Citrus latifolia*, Tanaka) no controle do sangramento menstrual excessivo são encontradas na internet, obtidos de informações populares, mas nenhum artigo científico foi encontrado.

O tratamento mais comum para distúrbios menstruais é o uso de AINEs (Anti-Inflamatórios Não Esteroidais), aliviando os sintomas ligados à dor e ao sangramento excessivo. Entretanto, o uso prolongado de AINEs pode levar a problemas colaterais como: lesão renal, úlcera gástrica, desenvolvimento de danos hepatotóxicos, declínio das funções cognitivas, entre outros (KUMMER. COELHO, 2002).

Considerando os riscos e efeitos colaterais desse tipo de tratamento, tem-se buscado cada vez mais fontes alternativas, como os produtos naturais, que proporcionem segurança e eficácia no controle do sangramento excessivo e outros sintomas da menstruação, com benefícios à saúde.

As plantas têm-se mostrado a principal fonte de princípios ativos com atividade anti-inflamatória, muitos estudos relacionados a isso são encontrados utilizando extratos de plantas, bem como substâncias isoladas, visando ensaios de inibição de COXs (ciclo-oxigenases), sendo que a principal classe de produtos naturais com essa atividade são os flavonoides (VERMA. PRATAP, 2010. RIBEIRO et al., 2015).

Citrus tem sido encontrado na literatura como tratamento tradicional para distúrbios menstruais em geral. Óleo essencial de *C. aurantiifolia* tem sido usado como relaxante do músculo liso. chá das folhas de *C. aurantium*, *C. limon*, e *C.*

sinensis alivia ondas de calor e acalma o nervosismo (OSOSKI et al., 2002. YASSIN, 2012. ANDEL et al., 2014).

Desordens menstruais também foram associadas ao mau funcionamento do fígado, sendo atribuído que flavonoides presentes em *C. limon* fortalecem o revestimento interno dos vasos sanguíneos ajudando a contornar distúrbios circulatórios e infecções do fígado (BHATIA et al., 2015).

Apesar de relatos sobre a ação biológica de citros no processo menstrual, o mecanismo de funcionamento não tem sido estudado.

1.2.1 Perfil químico do suco de limão Tahiti

Citrus latifolia ou limão Tahiti, como é conhecido, é o limão verde comum brasileiro (Figura 13). De acordo com a classificação botânica feita por Tanaka, pertence à família Rutaceae, gênero *Citrus* e espécie *Citrus* × *latifolia*, sendo resultante do cruzamento da lima da pérsia (*C. limettioides*) e o limão siciliano (*C. lemon*).

Na literatura poucos relatos a respeito da composição química do suco são encontrados, sendo que muitas vezes esse é confundido com *C. aurantifolia*, o qual também é chamado de *lime*.

Em estudo realizado por Nogata et al., 2006, o qual verificou a presença de flavonoides em diferentes partes dos frutos de várias espécies de citros. Os compostos encontrados na casca, albedo, flavedo e suco de *C. latifolia* estão listados na Tabela 9.

Os flavonoides identificados para o suco de limão Tahiti são flavanonas e flavonas O-glicosiladas. Composto majoritariamente por hesperidina e eriocitrina (56,0 e 47,1 mg/100g, respectivamente), seguido de rutina, naringina, narirutina e diosmina (Figura 14).

Tabela 9. Flavonoides presentes em frutos de *C. latifolia* (mg/100g de peso fresco).

Flavonoides	Suco	Casca	Flavedo	Albedo
Flavanonas				
Hesperidina	56,0	1210	462	1840
Eriocitrina	47,1	105	122	90,8
Naringina	4,0	10,3	13,7	7,4
Narirutina	2,2	56,3	17,6	88,3
Neoponcirina	1,1	7,7	2,3	12,2
Poncirina		36,7	71,8	7,7
Flavonas				
Rutina	13,4	6,6	13,3	
Isorhoifolina	5,5	55,3	13,3	90,1
Diosmina	2,2	52,5	43,5	60,0
Neodiosmina		20,4	40,5	3,7
Sinensetina		2,0	4,8	
Nobiletina		1,6	1,8	1,3
Tangeretina		1,0	2,1	

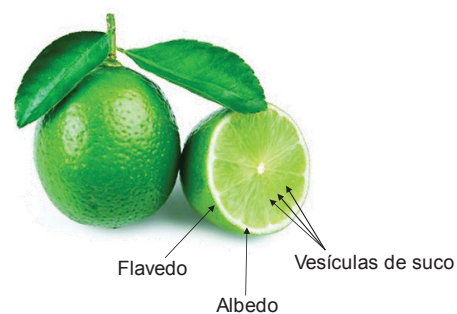


Figura 13. Fruto de limão Tahiti (*Citrus latifolia*).

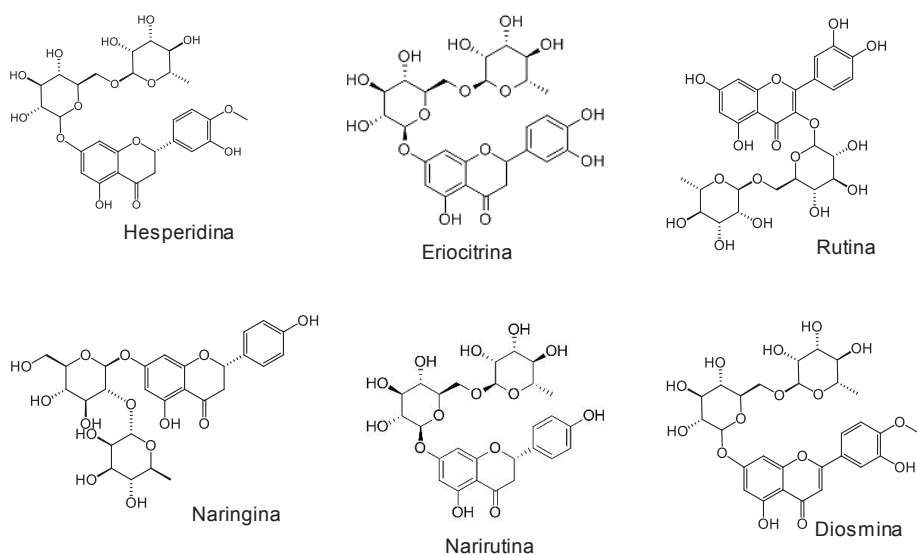


Figura 14. Flavonoides identificados no suco de *Citrus latifolia*.
Fonte: adaptado de Nogata et al., 2006.

1.3 BIOSÍNTESE DE FLAVONOIDES

Os flavonoides constituem uma das maiores classes de metabolitos secundários presentes nos vegetais, representando um dos grupos fenólicos mais importantes entre os produtos de origem natural. Apresentam muitas variações estruturais, resultando numa grande diversidade de subclasses, como: chalconas, flavanonas, flavonas, dibenzoilmetanos, flavonóis, isoflavonoides, antocianidinas, rotenoides entre outros. São compostos de baixa massa molecular e desempenham importante papel na fotossíntese celular, além de, apresentarem importantes atividades biológicas na natureza (DEWICK, 2002. VEITCH, 2010).

Nas plantas são responsáveis pela pigmentação, podendo ser considerados pigmentos naturais, sendo a coloração amarela conferida às chalconas e flavonóis, enquanto que coloração vermelha, azul e violeta, são conferidas às antocianidinas. Outros compostos incolores são atribuídos, por exemplo, as flavonas, as quais absorvem mais intensamente luz na região do UV, sendo detectadas pelos insetos, atuando como atrativos para agentes polinizadores de plantas (DEWICK, 2002).

Atuam também como protetores contra irradiação ultravioleta, absorvendo luz na região entre 240 – 400 nm, sendo duas bandas principais de absorção: banda I e II, as quais são características para cada subclasse:

Flavonas → Banda I entre 310-350 nm.

Flavonóis → Banda I entre 350-385 nm.

Banda II entre 240-290 é basicamente a mesma para qualquer subgrupo.

Flavanonas e dihidroflavonóis apresentam Banda I entre 300-330 nm, de baixa intensidade. enquanto que a Banda II é a banda principal entre 277-295 nm. A banda I é relacionada com a absorção do anel B, derivado da rota do cinamoil. E a banda II tem sua absorção referente ao anel A o qual é proveniente da rota do acetato (Figura 15).

Como exemplificado para flavonoides de citros, esses compostos são poderosos antioxidantes, devido a sua capacidade de reduzir a formação de radicais livres. Essa atividade é atribuída principalmente aos grupos hidroxilas que possuem hidrogênios com alta reatividade os quais são transferidos a um radical, estabilizando-o. Formam-se, assim, radicais flavonoides que reagirão com outros radicais livres, interrompendo a reação de propagação em cadeia, diminuindo o risco de várias

doenças degenerativas associadas ao estresse oxidativo celular (PIETTA, 2000. SANDHAR et al., 2011).

O esqueleto básico dos flavonoides é caracterizado pela presença de quinze átomos de carbono, formados por unidades $C_6-C_3-C_6$ correspondentes a dois anéis aromáticos interligados por uma cadeia de três átomos de carbono, podendo ou não estar ciclizado. Possuem rota biossintética mista, originados por uma molécula iniciadora de 4-hidroxicinamoil-CoA (rota do chiquimato), juntamente com três unidades de malonil-CoA, responsável pela extensão da cadeia, formando um intermediário policetídeo (rota do acetato). Por reação de condensação de Claisen, catalisada pela enzima chalcona sintase (CHS), ocorre a ciclização do policetídeo. após isso, ocorre enolização, para aromatização do anel, formando a chalcona em equilíbrio com a flavanona, caracterizando os dois primeiros esqueletos básicos de flavonoides, os quais são intermediários para gerar as outras classes (Figura 15).

A chalcona é ciclizada para flavanona por uma reação tipo Michael, ocorrendo o ataque nucleofílico do grupo hidroxila (fenol) à cetona α,β -insaturada. Essa etapa é catalisada pela enzima chalcona isomerase (CHI), favorecendo a isomerização estereoespecífica para a (2S)-flavanona, através de um mecanismo de catálise ácido-base (Davies & Schwinn, 2006). Após a formação desse metabólito secundário, uma série de reações enzimáticas envolvendo oxidações, reduções e alquilações originam os mais distintos esqueletos de flavonoides (DEWICK, 2002).

Enzimas glucosiltransferases (GTs), como UDP-glucose flavanona-7-O-glucosiltransferase (UFGT) e UDP-ramnose flavanona glucosídeo-ramnosiltransferase (UFGRT), convertem as agliconas em seus respectivos glicosídeos. Os principais flavonoides glicosilados em *Citrus* apresentam glucose + ramnose como unidades glicosídicas, e essas reações são catalisadas pela ramnosiltransferases: 1,2-ramnosiltransferases (1,2-RhaT) catalisa a biossíntese de neohesperidosídeos. enquanto que 1,6-ramnosiltransferases (1,6-RhaT) catalisa a biossíntese de rutinosídeos.

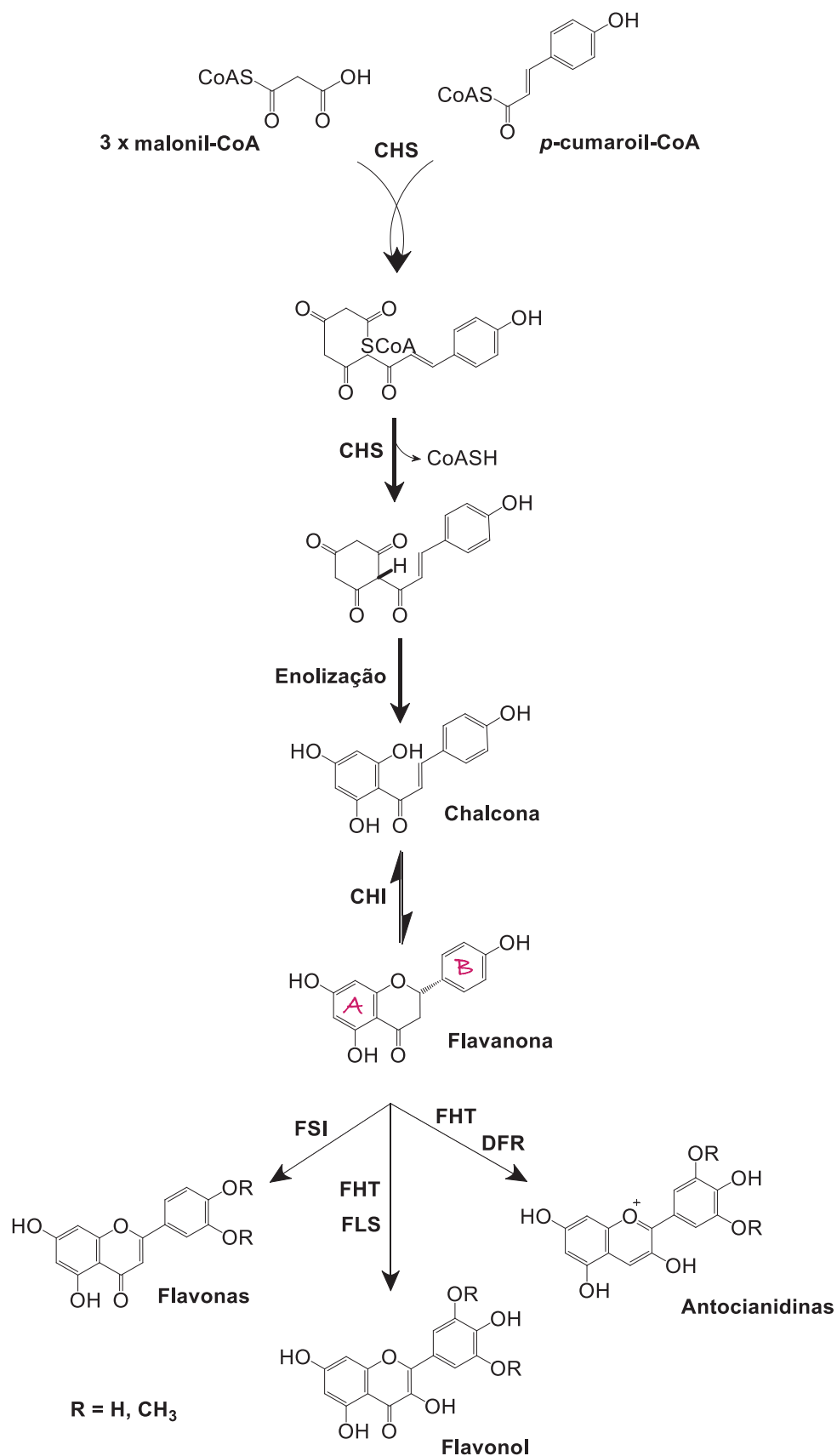


Figura 15. Biossíntese das principais classes de flavonoides encontrados no gênero *Citrus*. CHS: chalcona sintase. CHI: chalcona isomerase. FSI: flavona sintase. FHT: flavanona 3-hidroxilase. FLS: flavonol sintase. DFR: dihidroflavonol 4-redutase. Adaptado de Dewick, 2002 e Khan *et al.*, 2014.

As glicosilações em flavonoides podem ser O/C-glicosilados. Essa é considerada uma reação do tipo S_N2 via difosfato de uridina (UDPglucose) (Figura 16A). Essa reação, geralmente, leva a formação de glicosídeo com configuração β , devido ao UDPglucose ter seu grupo de saída na configuração α . A configuração β é a mais comumente encontrada na natureza, entretanto também é encontrada a formação do isômero α , em menor ocorrência.

A formação de C-glicosilação ocorre de forma semelhante à reação de C-alquilação, devido à presença de um carbono nucleofílico, no caso dos flavonoides, o sistema fenol (Figura 16B).

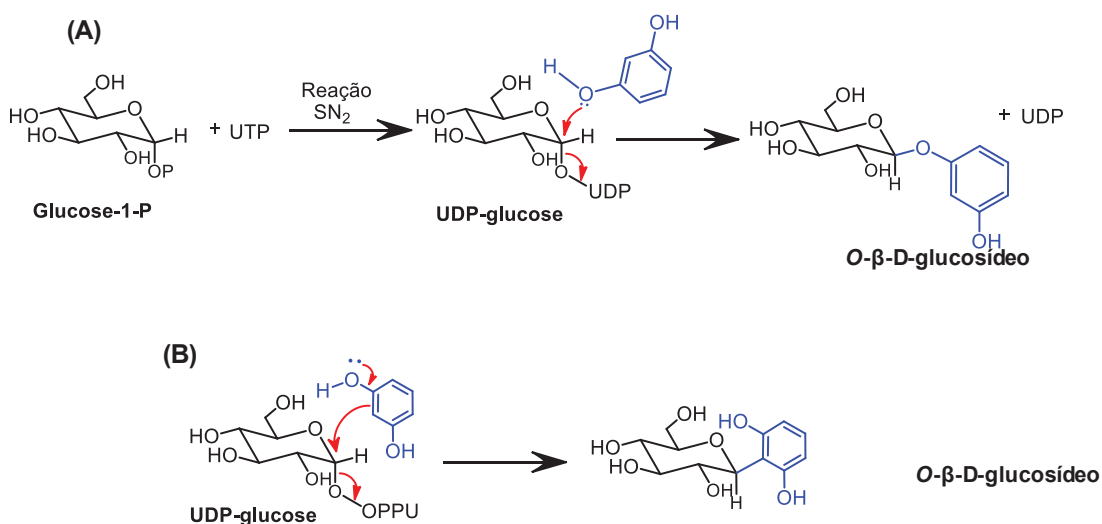


Figura 16. Reações de formação de A) O-glicosilação e B) C-glicosilação.
Adaptado de Dewick, 2002.

1.4 FLAVONOIDES DE CITROS E INFLAMAÇÃO

Flavonoides são muito bem conhecidos por apresentarem um amplo espectro de atividade biológica, como antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, além da capacidade de modular funções enzimáticas, apresentando-se como potentes inibidores de enzimas, dentre elas fosfolipase A2, lipoxigenase e ciclo-oxigenases (HWANG. SHIH. YEN, 2012. KUMAR. PANDEY, 2013. PANCHE. DIWAN. CHANDRA, 2016).

Esses compostos modulam a biossíntese de prostaglandinas através da inibição principalmente da enzima COX-2. Os flavonoides chrisina, baicaleina, e

apigenina mostraram inibição do complexo enzimático COX ao nível da aspirina, com IC_{50} 2,8, 2,5 e 3,3 μ M, respectivamente, enquanto a aspirina foi ativa a 2,9 μ M. Um derivado sintético 3',4'-dicloro-5-metoxiflavona mostrou atividade (IC_{50} 0,1 μ M) ao nível do fármaco N-(2-ciclohexiloxi)-4-nitrofenilmetano sulfonamida (NS-398), o qual é altamente seletivo à COX-2 com $IC_{50} < 0,1$ μ M (VERMA. PRATAP, 2010).

Muitas atividades biológicas estão associadas aos flavonoides de citros, como: anticâncer (TRIPOLI et al., 2007. KE et al., 2015).. intervenção de doenças degenerativas (JÄGER. SAABY, 2011). inibição de respostas inflamatórias devido ao bloqueio da adesão celular de neutrófilos e leucócitos (BENAVENTE-GARCÍA. CASTILLO, 2008. KE et al., 2015).. inibição de COX-2 e iNO₂ (óxido nítrico sintase) (CHEN. TAIT. KITTS, 2017) e citocinas pro-inflamatórias (IMPELLIZZERI et al., 2016), entre muitas outras atividades.

Alguns exemplos de flavonoides encontrados em citros com atividade anti-inflamatória, bem como mecanismos de ação são citados na literatura. Derivados de luteolina mostraram atividade anti-inflamatória pela modulação da expressão de genes de COX-2, óxido nítrico sintase e citocinas inflamatórias (ZIYAN et al., 2007).

Rutina, quercetina e hesperidina apresentaram efeitos anti-inflamatório em ambas fases, aguda e crônica. Hesperitina, naringenina e rutina, também se mostraram candidatos à inibição da atividade de COX, bem como prostaglandina E₂ (SHEN et al., 2002. PANCHE. DIWAN. CHANDRA, 2016).

Flavonoides como hesperidina, diosmina e apigenina atuam bloqueando a síntese de derivados do ácido araquidônico, como prostaglandinas, bem como outros fatores relacionados à inflamação. Hesperidina, neohesperidina e hesperitina exibem mecanismos de neuroproteção contra danos oxidativos, inibindo formação de espécies oxidativas de oxigênio (HWANG. SHIH. YEN, 2012. PANCHE. DIWAN. CHANDRA, 2016).

Naringina e naringenina de extratos de citros apresentaram atividade relacionada a síndromes metabólicas, como obesidade, hipertensão, diabetes e problemas cardiovasculares (ALAM et al., 2014). Naringina também atua no sistema imune evitando danos teciduais, enquanto que naringenina é capaz de inibir enzimas-chaves no processo de oxidação de ácidos graxos, bem como inibição de fator de transcrição NF- κ B, reduzindo a produção de proteína pró-inflamatória IL-6 (YOSHIDA et al., 2010. KE et al., 2015).

Quercetina mostrou significativa atividade diante da inibição de histamina, mediador de processo inflamatório e alérgico. Diosmina e hesperidina apresentaram atividade inibitória de prostaglandinas E_2 e $F_{2\alpha}$ (MANTHEY. GUTHRIE. GROHMANN, 2001).

A combinação de hesperidina, nobiletina e tangeretina mostraram potente supressão de agentes pró-inflamatórios como iNO_2 , $TNF-\alpha$ e interleucinas $IL-1\beta$ e $IL-6$, atuando como agente anti-neuroinflamatório (HO. KUO, 2014).

Antocianinas de extrato de fruto de laranja moro (*C. dulcis*) tem sido utilizado na forma de fitoativo, chamado CitrusiM® (Florien), o qual é indicado como redutor de medidas e contra síndrome metabólica, elevando a sensibilidade à insulina.

1.4.1 Inflamação, prostaglandinas e ciclo-oxigenases

A inflamação é um processo fisiológico que constitui parte da resposta imune, sendo produzida por células imunes do tecido, devido a estímulos internos e/ou externos, as quais liberam mediadores específicos que controlam a circulação local e as atividades celulares. A fim de eliminar a causa da lesão e iniciar a recuperação do tecido.

Mediadores de inflamação são substâncias químicas endógenas produzidas por diferentes rotas metabólicas do processo inflamatório. Dentre elas destaca-se a cascata do ácido araquidônico, tendo como principais reações catalisadas pelas enzimas fosfolipase A2, ciclo-oxigenase (COX) e lipoxigenase em respostas inflamatórias. Essas enzimas são responsáveis pela síntese de prostaglandinas e outros agentes pró-inflamatórios (WHITE, 1999).

Ciclo-oxigenases são enzimas classificadas como membros da família mieloperoxidases e são responsáveis pela síntese de compostos relacionados aos processos inflamatórios, como as prostaglandinas (CHANDRASEKHARAN. SIMMONS, 2004).

Também chamada de prostaglandina sintase, nos mamíferos são encontradas duas principais isoformas desta enzima: COX-1 e COX-2. Ambas apresentam cerca de 600 aminoácidos cada em sua estrutura e localizam-se no lúmen do envelope nuclear e no retículo endoplasmático. A COX-1 é uma enzima constitutiva, ou seja, atua em processos fisiológicos normais do organismo, sendo responsável, por exemplo, pela síntese das prostaglandinas que regulam a secreção da mucina

gástrica. Enquanto que a COX-2 é indutiva, o que significa que seu gene codificante induz sua produção nos locais de inflamação por citocinas produzidas por leucócitos, sintetizando prostaglandinas que controlam inflamação, dor e febre, atuando como sinalizadores químicos no processo inflamatório (SIMMONS, 2004. ROUZER. MARNETT, 2009. LONE. TASKÉN, 2013).

A principal diferença entre essas duas isoenzimas é que, no domínio catalítico, enquanto a COX-1 possui um resíduo de isoleucina na posição 523, a COX-2 apresenta a valina como substituinte, na mesma posição, o que parece ser responsável pelas seletividades distintas (Figura 17).

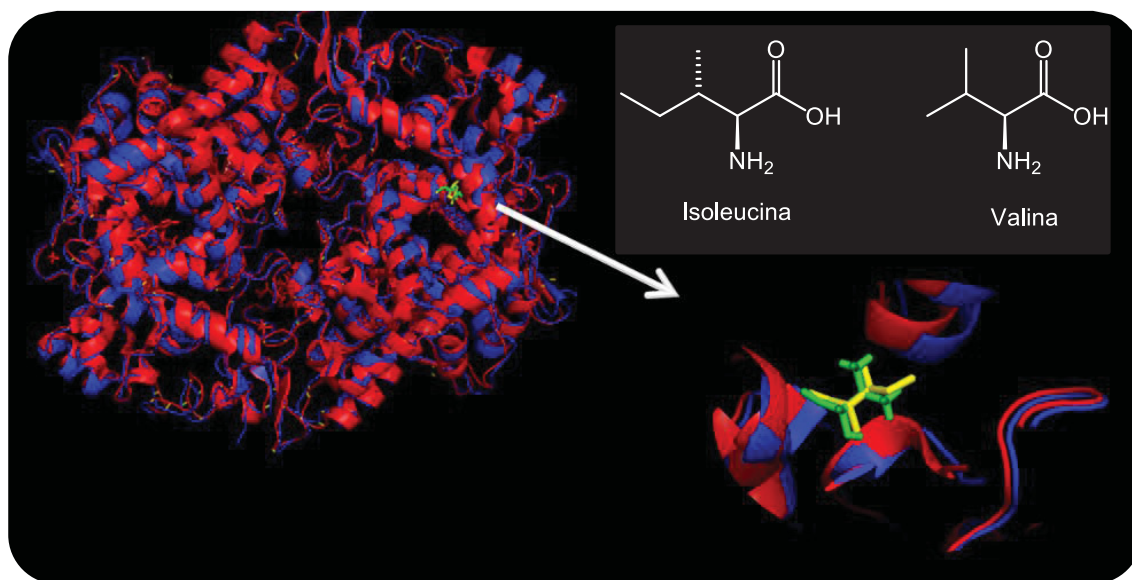


Figura 17. Estruturas sobrepostas de COX-1 (vermelha) e COX-2 (azul), mostrando a principal diferença na posição 523 (ampliação à direita) pela presença de isoleucina em COX-1 e valina em COX-2. Adaptado de Simmons *et al.*, 2004.

A rota biossintética do ácido araquidônico (AA) para conversão em prostaglandinas inicia-se pela ação da enzima ciclo-oxigenase, em que o AA é ciclizado e oxidado, levando a formação do intermediário endoperóxido PGG₂, identificado, pela primeira vez, por Samuelsson e colaboradores em 1973 (HAMBERG. SAMUELSSON, 1973. HAMBERG *et al.*, 1974). Essa etapa é catalisada pela presença da tirosina na posição 385 (Tir385) do bolso catalítico da COX, formando um radical tirosila, o qual abstrai um hidrogênio radicalar H[•] 13-pro(S) do AA, criando um radical araquidonila ativado em C11 e, posterior, C9, onde o oxigênio molecular radicalar ataca, formando o endoperóxido. O radical localizado em C15 é formado por uma segunda molécula de oxigênio radicalar, abstraindo novamente o

hidrogênio radicalar da Tir385, formando o intermediário hidroperoxila PGG₂ e regenerando o radical tirosila (Figura 18).

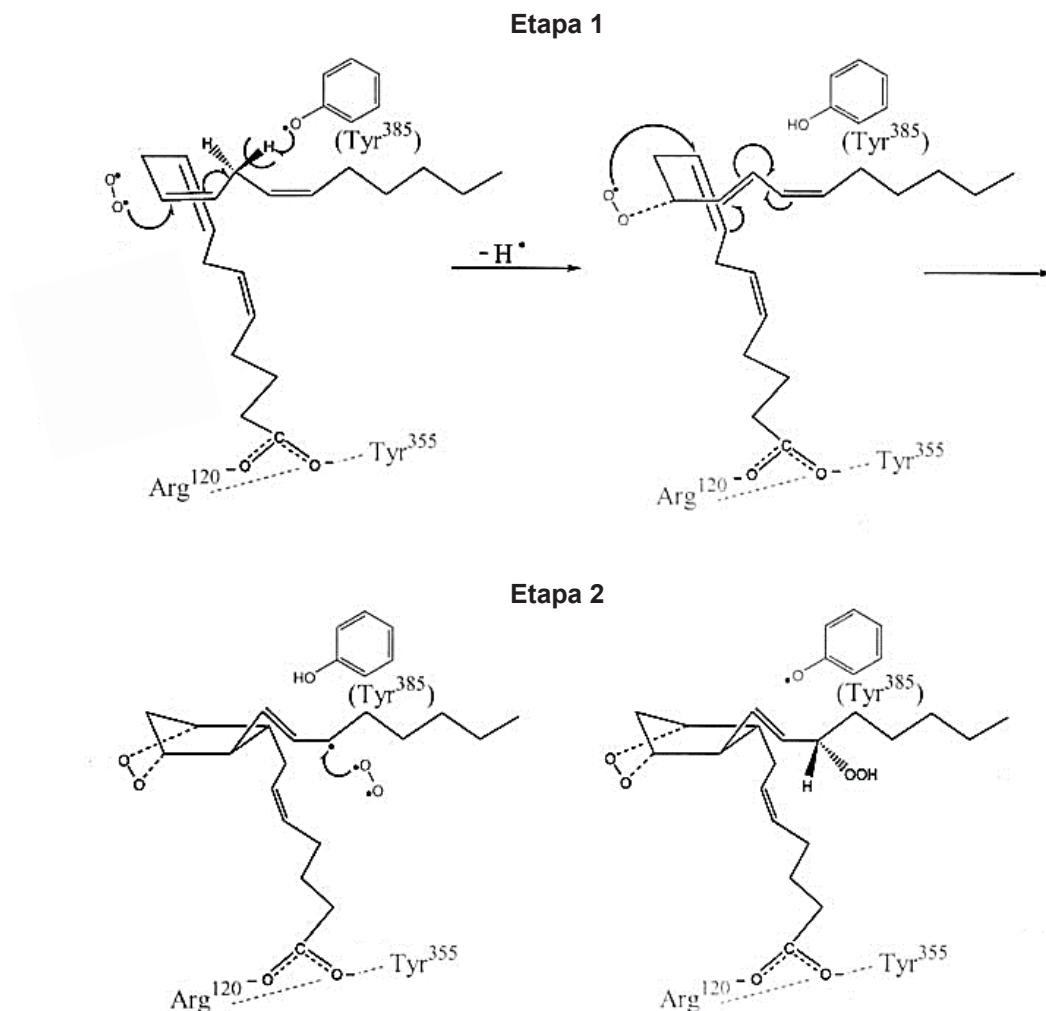


Figura 18. Etapa catalítica na reação de ciclo-oxigenação do AA, na presença do radical tirosila e oxigênio molecular. Fonte: Simmons *et al.*, 2004.

Numa segunda etapa, a COX reduz o grupo peróxido para hidroxila (álcool), em PGG₂, devido a presença do sítio ativo peroxidase, levando a formação do segundo intermediário, o PGH₂. A partir desse, outras enzimas como isomerases e oxiredutases metabolizam vários outros isômeros, usando PGH₂ como substrato (CHANDRASEKHARAN. SIMMONS, 2004. SIMMONS, 2004. ROUZER. MARNETT, 2009).

Devido a sua importância nos processos inflamatórios, COX-2 se tornou alvo de drogas como Anti-Inflamatórios Não Esteroidais (AINEs), os quais constituem um grupo heterogêneo de substâncias, tendo em comum, ações terapêuticas, como

atividade antipirética, analgésica e anti-inflamatória (KUMMER. COELHO, 2002). Esses fármacos inibem competitivamente o sítio ativo da COX, com exceção da aspirina (Figura 24), a qual se liga covalentemente, acetilando o resíduo Ser530 da COX-1 e Ser516 da COX-2, sendo mais potente para a COX-1 em relação à COX-2 (SIMMONS, 2004. LONE. TASKÉN, 2013) (Figura 19).

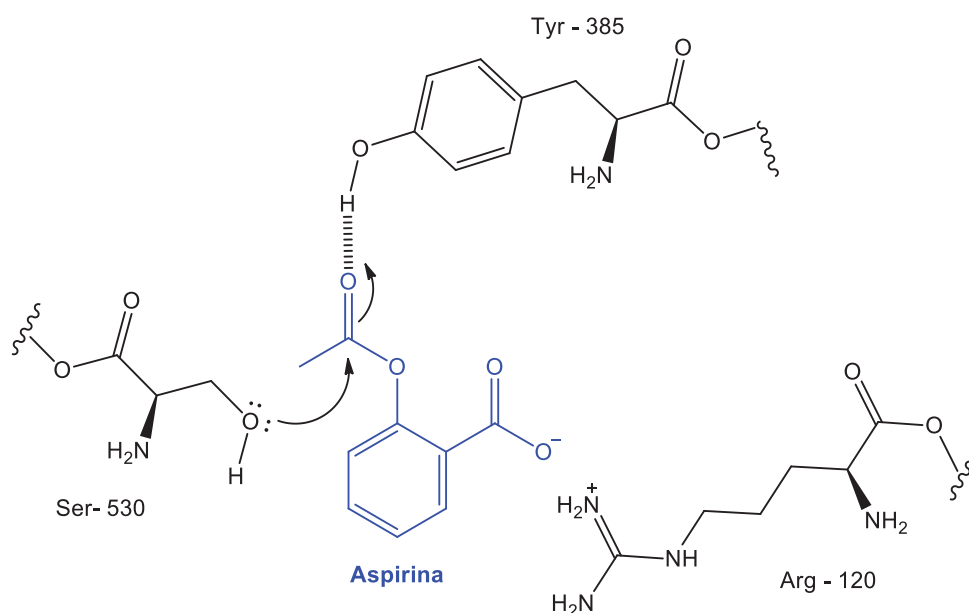


Figura 19. Representação do mecanismo de inibição da COX-1 pela aspirina (em azul). Mesmos sítios de ligação do ácido araquidônico e AINEs. Adaptado de Simmons *et al.*, 2004

Uma importante aplicação de AINEs tem sido para casos de sangramento menstrual excessivo ou anormal, reduzindo sensivelmente a perda sanguínea. Entretanto, esses medicamentos causam muitos efeitos colaterais, como irritação e problemas renais e do trato gastrointestinal, devido ao fato de inibir ambas COXs (SIMMONS, 2004. LONE. TASKÉN, 2013).

Alguns fármacos como nimesulida, celoxib, rofecoxib e meloxicam mostram atividade de inibição maior para COX-2 do que COX-1, mas não são totalmente seletivos para COX-2. Entretanto alguns desses medicamentos, como o rofecoxib, foram retirados de circulação, uma vez que são responsáveis pelo aumento do risco de ataque cardíaco e efeitos colaterais cardiovasculares.

Diante desse panorama, a busca por novos compostos que apresentem atividade seletiva para COX-2, evitando assim efeitos colaterais adversos, tem sido intensamente investigada. Existem várias substâncias naturais com atividade anti-inflamatória, principalmente usando extratos de plantas e compostos isolados em

ensaios de inibição de COXs. Conforme relatado anteriormente, uma das principais aplicações dos flavonoides de citros é na inflamação, com atividade de inibição de COXs comprovada.

Sendo assim, diante da confirmação prévia da ação do suco de limão Tahiti no processo inflamatório menstrual, reduzindo sensivelmente o sangramento, e da atividade anti-inflamatória dos flavonoides em citros, levanta-se a hipótese de que o mecanismo de regulação do sangramento excessivo no ciclo menstrual seria controlado principalmente por flavonoides, inibindo a síntese de mediadores inflamatório da via da ciclo-oxigenase.

Diante do exposto esse trabalho propôs a identificação dos principais metabólitos do suco de limão Tahiti e ensaio de inibição enzimática de COXs utilizando suco de limão fresco e padrões de flavonoides identificados.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O presente capítulo tem como objetivo avaliar a composição química do suco do limão Thaiti (*Citrus latifolia*) e sua atividade de inibição das enzimas ciclo-oxigenases 1 e 2.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Desenvolver um método para análise e caracterização do perfil químico do suco do limão Tahiti por LC-MS/MS (Qq-TOF).

Esses experimentos foram desenvolvidos no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos - SP, no laboratório Separare, sob a supervisão da Profa Dra Quezia B. Cass e Profa Dra Maria Fátima F. Silva.

2. Avaliação da inibição da atividade enzimática das COXs pelo suco e compostos identificados.

Esses testes foram realizados em colaboração com a Profª Drª Daniela Chagas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Alfenas - MG.

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 SOLVENTES E PADRÕES

Para o preparo de amostra e análises cromatográficas foram utilizados solventes orgânicos grau HPLC Mallinckrodt Baker (St. Louis, USA). A água utilizada para fase móvel foi purificada usando sistema Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brazil), ácido fórmico ($\geq 95\%$) adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

Os padrões dos flavonoides hesperidina (hesperetina-7-O-rutinosídeo), naringina (naringenina-7-O-neohesperidoside), rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo), naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona), quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona), ácido cafeico (ácido-3,4-dihidroxicinâmico) e ácido gálico (ácido-3,4,5-trihidroxibenzoico) ($\geq 97\%$, grau HPLC) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os padrões eriocitrina (eriodictiol-7-O- rutinosídeo) e narirutina (naringenina-7-O-rutinosídeo) (98%, grau HPLC) foram adquiridos da Interprise (USA).

As soluções padrão e estoque foram armazenados à -20°C durante a realização das análises e as fases móveis foram preparadas na razão volume/volume.

3.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Para obtenção dos espectros de RMN ^1H foi utilizado o espectrômetro de ressonância magnética nuclear Advance-400 (Bruker), operando a 400 MHz para hidrogênio.

3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ULTRAVIOLETA

Para as análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi utilizado o sistema cromatográfico Agilent 1260, com injetor automático, detector de arranjo de diodos (DAD), a aquisição e tratamento dos dados foi realizada utilizando o software OpenLab Ezchrom Elite. Foi utilizado modo reverso de eluição: coluna XSelect HSST3 Waters (3,5 μm , 2,1 x 100 mm), volume de injeção 10 μL , vazão 0,350 $\mu\text{L}/\text{min}$.

3.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O sistema cromatográfico líquido de ultra eficiência utilizado (Shimadzu Kioto, Japão) consiste em duas bombas quaternárias LC-30AD, ambas equipadas com unidade de gradiente de baixa pressão, auto-injetor SIL-30AC com alça de amostragem de 500 μL , dois degaseificadores DGU-20ASR, forno CTO-20AC e controladora CBM 20A. acoplado aos detectores de DAD (SPD-M30A) e ao espectrômetro de massas QqToF Impact HD (Bruker Daltonics GmbH, Alemanha) equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI).

Para os experimentos de desreplicação do suco de limão foi usado coluna XSelect HSST3 (3,5 μm , 2,1 x 100 mm) com pré-coluna, 5 μL para volume de injeção, vazão de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$, 40°C, gradiente: 5 - 35% de ACN (0,1% ácido fórmico) em H_2O (0,1% ácido fórmico), por 30 minutos. Foram realizados experimentos de íons totais e de íons produtos auto-MS/MS e MS/MS com diferentes CIDs, nos modos de ionização: positivo e negativo.

As análises da solução dos padrões, foram realizadas utilizando uma coluna XSelect HSST3 (3,5 μm , 2,1 x 100 mm) com pré-coluna, 5 μL para volume de injeção, vazão de 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, 40°C, gradiente: 5 - 35% de ACN (0,1% ácido fórmico) em H_2O (0,1% ácido fórmico), por 30 minutos. O suco também foi testado nessas condições para comparação dos tempos de retenção. Foram realizados experimentos de íons totais e de íons produtos auto-MS/MS, nos modos de ionização: positivo e negativo.

Faixa de massa de 80 a 1300 m/z . As condições da fonte de ionização foram: nebulizador 1,7 bar, vazão do gás de secagem 9,3 L min^{-1} , temperatura de secagem 200°C, tensão do *end plate* e capilar de 500V e 4500V, respectivamente.

Os cálculos de massa exata foram realizados utilizando os softwares Compass IsotopePattern (Bruker) e ChemDraw Pro (Cambridge). E os dados foram processados utilizando o software DataAnalysis.

3.5 PREPARO DAS AMOSTRAS

Os frutos foram adquiridos em comércio local e o suco foi extraído à mão. O suco de 5 limões foi espremido e agrupado, centrifugado por 10 min à 8.000 rpm e 20°C.

Para extração por fase sólida foi utilizado cartuchos Oasis HLB 3cc (60mg) (Waters, Milford, USA). A fração orgânica foi concentrada em Speedvac, 40°C, por 12 horas. Após isso, ressuspensa em 1 mL de H₂O:ACN (95:5 v/v), ambas as fases acidificadas (0,1% ácido fórmico), e injetadas no sistema cromatográfico. Duas concentrações foram testadas: 5 mg mL⁻¹ e 15 mg mL⁻¹.

Os padrões de flavonoides e ácidos orgânicos foram preparados na concentração de 50 µg mL⁻¹ em H₂O:ACN (95:5 v/v), ambas as fases acidificadas (0,1% ácido fórmico), e injetadas no sistema cromatográfico.

Os padrões e solução estoque foram armazenados a -20°C durante as análises.

Para análise por RMN a fração orgânica, referente ao suco de 5 limões, foi solubilizada em metanol deuterado (CD₃OD) (99,8%, Sigma-Aldrich).

3.6 ENSAIO *IN VITRO* DE INIBIÇÃO DE COX-1 E COX-2

O ensaio foi realizado utilizando kit de triagem de inibidores de COX-1 e COX-2 (número de catálogo 560101, Cayman Chemical). A avaliação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

O suco de um limão foi espremido manualmente e testado fresco. As amostras foram diluídas utilizando o tampão (Tris-HCl 0,1 M. pH 8. 5 mM de EDTA e 2 µL de fenol, TPC), o mesmo é utilizado para o desenvolvimento da reação.

Para diluição do suco foram pipetados 10 µL do mesmo e a concentração final foi determinada levando-se em conta o volume total de 200 µL do poço no qual ocorre a reação. As amostras (10µL) foram incubadas por 5 min, a 37°C com a COX (10 µL) e a solução de heme (10 µL) em solução tampão (160 µL). Após adição da solução de ácido araquidônico (10 µL) as soluções foram incubadas por mais 2 min. Os tubos foram removidos do banho (37°C) e adicionou-se 30 µL de solução saturada de cloreto de estanho (SnCl₂). As concentrações de suco fresco avaliadas foram: 5%. 2,5%. 1,25% e 0,62%. Os padrões de flavonoides testados foram hesperidina, rutina e eriocitrina, nas concentrações: 64 µg mL⁻¹. 16 µg mL⁻¹. 8,0 µg mL⁻¹ e 4,0 µg mL⁻¹.

A produção de PG na etapa de reação foi dosada em imunoensaio (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay – ELISA). Esta etapa foi realizada exatamente como o descrito no kit, na diluição recomendada de 1:2000. As placas de 96 poços foram lavadas com tampão. O reagente de Elman foi adicionado a cada poço. O produto da

reação enzimática foi lido em leitor de placa no comprimento de onda de 405 nm. A quantidade de PG foi mensurada por interpolação da densidade ótica obtida em curva de densidade ótica por concentração de PG.

As porcentagens de inibição foram determinadas e, assim, calculou-se a concentração inibitória de 50% da atividade enzimática (IC_{50}). As amostras foram ensaiadas em duplicatas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos sobre a composição química de citros têm sido amplamente realizados, sendo a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas a técnica mais utilizada para identificação e quantificação desses metabólitos.

O estudo do suco de limão Tahiti foi realizado com frutos disponíveis em comércio local, buscando selecionar frutos jovens, uma vez que se sabe que os metabólitos secundários de citros apresentam menor concentração à medida que os órgãos crescem e amadurecem (KHAN et al., 2014).

4.1 ENSAIOS PRELIMINARES DO SUCO DE LIMÃO TAHITI

Inicialmente, foi realizada uma análise preliminar por ressonância magnética nuclear (RMN), a fim de se ter uma ideia da composição do suco de limão Tahiti para melhor direcionamento do estudo dessa matriz. Para isso, o suco de cinco (5) limões foi espremido manualmente e misturado para obter uma matriz abrangente que representasse a composição geral dos diferentes espécimes do limão. Após centrifugação o sobrenadante foi concentrado em SpeedVac e ressuscitado em metanol deuterado (CD_3OD) para realização do experimento de RMN ^1H (Figura 20).

No espectro de RMN ^1H foram observados sinais na região entre 1,0 a 4,5 ppm, sendo estes referentes a açúcares livres. Não foi observado, entretanto, sinais na região de aromáticos (~ 5,0 a 9,0 ppm), como esperado para flavonoides. Em um estudo realizado por MEDINA et al., 2013, foi determinada a composição nutricional e a concentração para uma mistura de suco de laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e suco de limão (*Citrus limon* (L.) Burm), em que para 400 mL desta mistura, foi quantificado cerca de 13 gramas de açúcares totais, enquanto que para os fenólicos totais foram encontrados apenas cerca de 115 mg (Tabela 10).

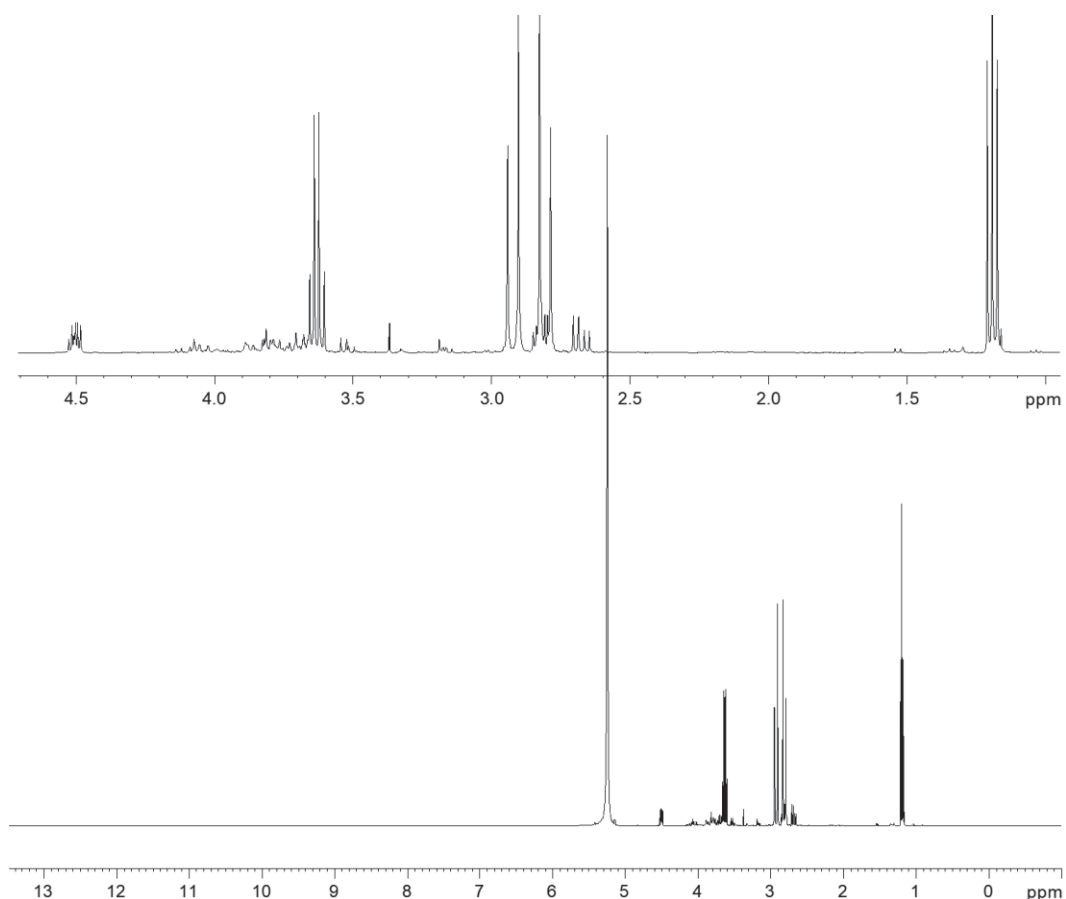


Figura 20. Abaixo: espectro de RMN ^1H do suco de limão Tahiti puro em CD_3OD (400 MHz). Acima: região do espectro expandida de 1,0 a 4,5 ppm.

Tabela 10. Quantidades de metabólitos detectados em 400 mL de uma mistura de suco de *C. sinensis* (laranja) e *C. limon* (limão).

Açúcares (g)	Fenólicos (mg)
Açúcares totais 13,3	Polifenois totais 115
Glucose 6,24	Flavanonas 86,1
Sacarose 2,56	Flavonas 29,4
Frutose 4,48	

Adaptado de Medina *et al.*, 2013.

Essas quantidades comprovam a baixa concentração dos metabólitos secundários, como flavonoides, no suco, o que explica a não visualização dos sinais correspondentes a estes no espectro de RMN. Os sinais referentes aos açúcares livres, pela alta concentração no suco, acabam por mascarar os sinais dos outros metabólitos em menor concentração. Sendo assim, esta análise serviu para o

entendimento da necessidade de um tratamento de amostra para o suco, a fim de se obter uma fração rica em metabolitos secundários, os quais são o interesse desse trabalho.

4.2 EXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA - *SPE*

Devido a necessidade da remoção dos açúcares livres do suco para obtenção dos compostos de interesse para análise por cromatografia em fase líquida, o processo de preparo de amostra selecionado foi a *SPE*, uma vez que essa técnica permite a remoção dos interferentes e concentração dos metabólitos de interesse de maneira eficiente (conforme explicado na Introdução do Capítulo I, item 1.1.1).

Para isso foi utilizado o modo *SPE off-line* e foram realizados alguns testes iniciais para otimização do processo de limpeza, como escolha da fase estacionária do cartucho, sendo testadas: C18, ciano, fenil e OASIS HLB. As amostras foram analisadas por LC-DAD e destas, a que apresentou melhor eficiência de extração dos analitos de interesse, avaliando os cromatogramas obtidos, foi a OASIS HLB. Este é um adsorvente universal para compostos ácidos, básicos e neutros, caracterizando-se devido ao chamado equilíbrio/balanço hidrofílico-lipofílico (HLB, do inglês, *hydrophilic-lipophilic balance*). Sendo a composição química desse polímero os monômeros de N-vinilpirrolidona (hidrofílico) e divinilbenzeno (lipofílico), proporcionando alta capacidade de retenção em fase reversa, além de ser estável a faixas de pH extremas e compatível com uma ampla faixa de solventes (dados do fabricante).

Depois de selecionado a melhor fase estacionária, seguiu-se com a otimização dos solventes de limpeza e eluição. Como o suco é uma amostra aquosa, a eluição dos açúcares livres foi realizada com H₂O (0,1% de ácido fórmico) para aumentar a retenção dos compostos fenólicos na fase estacionária, uma vez que esses compostos são ácidos, devido à presença de grupos hidroxilas. Os flavonoides glicosilados, por exemplo, apresentam pKa em torno de 10 (MAJUMDAR. SRIRANGAM, 2009), enquanto que os ácidos fenólicos, como é o caso do ácido cafeico, tem pKa em torno de 4,5. Sendo assim, a fase móvel ácida mantém estes compostos em sua forma protonada. Considerando que, para manter os compostos em sua forma protonada, o pH da solução deve ser em torno de 2 unidades abaixo do

pKa. Sendo assim, para os ácidos fenólicos, o pH ideal da fase móvel é em torno de 2,5. O pH mensurado para H₂O (0,1% ácido fórmico) foi de 2,78.

Para eluição da fração de interesse, foram testadas as seguintes misturas de solventes: H₂O:ACN e H₂O:MeOH, com e sem ácido (0,1% de ácido fórmico), além de diferentes proporções de solventes orgânicos. Entretanto, ao se avaliar as diferentes concentrações de solvente orgânico, a concentração de metabólitos obtida no fracionamento era muito baixa, difícil de ser detectado nas análises cromatográficas. Sendo assim, optou-se pela eluição não fracionada dos compostos de interesse, ou seja, estes foram eluídos em 100% de solvente orgânico para se obter uma fração mais concentrada e sendo analisados em uma única análise cromatográfica. Além disso, a eluição foi testada com metanol e acetonitrila, separadamente. Entretanto, observou-se que a eluição foi mais eficiente quando utilizou-se a solução de ACN:MeOH (50:50, v/v). Todas as frações foram analisadas por LC: amostra, interferentes e fração orgânica, a fim de verificar qualitativamente a eficiência de extração.

O procedimento otimizado foi:

1. Ativação do cartucho: MeOH – 3mL.
2. Condicionamento do cartucho: H₂O (0,1% AF) – 3mL
3. Aplicação da amostra: 5mL do sobrenadante do suco centrifugado
4. Eluição dos interferentes: H₂O (0,1% AF) – 3mL
5. Eluição dos analitos de interesse: ACN:MeOH (50:50, v/v)

A fração orgânica apresentou coloração amarela, a qual pode ser atribuída a presença dos flavonoides. O solvente foi removido utilizando centrífuga rota-evaporativa (speedvac), à 40°C por 12h. A amostra foi solubilizada em solvente para análise cromatográfica.

4.3 ANÁLISE POR CROMATOGRÁFICA LÍQUIDA ACOPLADA A ULTRAVIOLETA

Para análise da composição química da fração orgânica obtida do suco de limão, foi desenvolvido e otimizado um método por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Para isso, iniciou-se a análise com um gradiente exploratório: 5 - 90% de ACN (0,1% ácido acético) em H₂O (0,1% ácido acético), em modo reverso de eluição.

A partir dessa análise inicial, o método foi otimizado visando a separação do maior número de compostos (bandas cromatográficas) possível (Tabela 11).

Tabela 11. Condições otimizadas para método cromatográfico para análise da fração orgânica de suco limão Tahiti.

Tempo (min)	H ₂ O (0,1% AcA)	ACN (0,1% AcA)	Eventos
0 - 4	90	10	Eluição dos compostos do suco de limão
4 - 10	80	20	
10 - 15	80	20	
15 - 17	65	35	
17 - 20	100	0	Limpeza da coluna
20 - 22	100	0	
22 - 30	90	10	Condicionamento

Vazão: 0,350 mL min⁻¹. AcA: Ácido Acético.

Coluna cromatográfica XSelect HSS T3 C-18 (3,5 µm, 2,1 x 100 mm).

Após a otimização do método, alguns padrões de flavonoides foram eluídos a fim de verificar sua presença na matriz. Os padrões avaliados foram: hesperidina, eriocitrina, narirutina, naringina, rutina, naringenina, quercetina, ácido cafeico e ácido gálico (50 µg mL⁻¹). Conforme citado anteriormente, na introdução deste capítulo, esses compostos são comumente encontrados em espécies de *Citrus*, sendo que alguns já foram identificados em *Citrus latifolia* e em outras espécies do mesmo gênero.

Entretanto, observou-se que os tempos de retenção de alguns padrões não sobrepõem exatamente as bandas referentes aos possíveis compostos na matriz, como é o caso da eriocitrina e a hesperidina. Diante desse problema, foi preparada uma amostra com a matriz fortificada com 40 µg mL⁻¹ de cada composto, a fim de observar quais bandas aumentavam a intensidade, significando com isso a presença ou não do padrão (Figura 21).

Avaliando os cromatogramas obtidos, observa-se que no cromatograma do suco fortificado com os padrões (em verde), referente à concentração de 40 µg mL⁻¹ mais à quantidade presente no suco de cada respectivo composto, há um aumento elevado na banda referente ao ácido cafeico (1), mostrando que este está presente em concentração muito baixa no suco ao ser comparado com o cromatograma em azul.

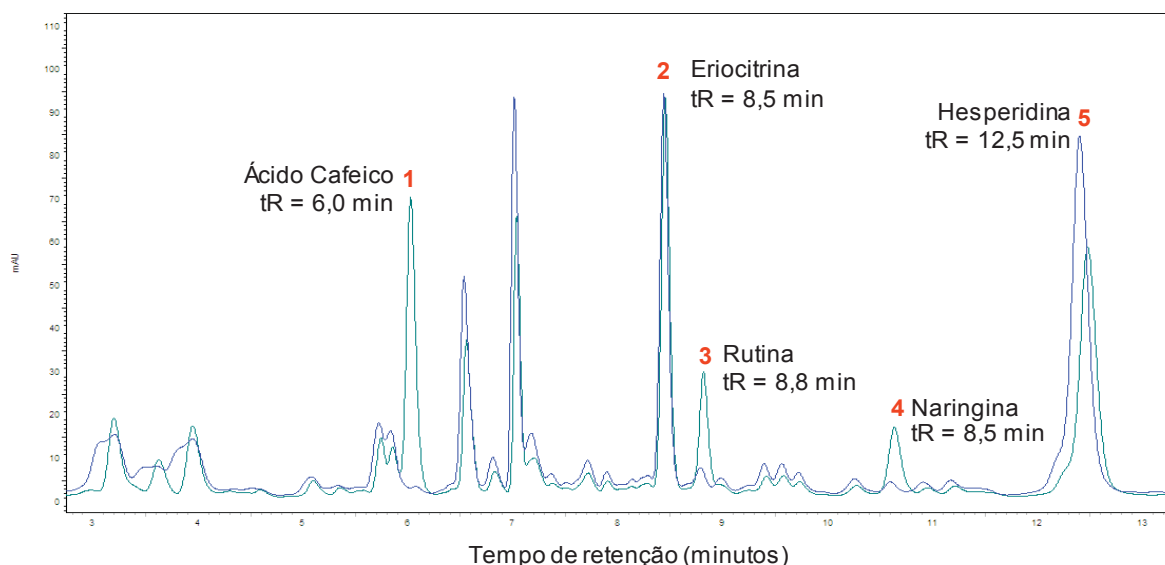


Figura 21. Região ampliada dos cromatogramas sorbepostos. Azul: suco de limão Tahiti. Verde: suco fortificado com os padrões ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Enquanto que, a banda referente à eriocitrina (2) está numa concentração muito semelhante à da matriz. Para rutina (3) e naringina (4) a concentração na matriz fortificada é cerca de 5 a 6 vezes maior à que no suco original. Já para o caso da hesperidina (5) há uma incoerência, uma vez que a concentração no suco original (azul) parece ser maior que a matriz fortificada (verde), o que deveria ser o contrário. Nesse caso, ainda, as bandas não se sobrepõem integralmente, o que não permite saber se é ou não a hesperidina.

Embora as análises por LC-DAD possibilitaram identificar a presença de alguns compostos no suco, bem como estimar sua concentração relativa, esta técnica é muito pouco precisa, uma vez que, diferentes flavonoides que apresentam pequenas modificações estruturais, não são possíveis de serem identificados com exatidão. Devido ao fato, dessas estruturas apresentarem espectros no UV muito semelhantes, o que pode levar a uma atribuição errônea.

Diante deste problema, e do fato de que algumas bandas não apresentaram pureza suficiente para seguir com a quantificação, optou-se por realizar análise do suco utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Essa técnica permite uma correta identificação, na maioria dos casos, por meio da elucidação estrutural baseada na massa do composto e seus padrões de fragmentação, e, ainda, por comparação com a literatura. Tornando possível a identificação dos compostos sem necessidade de completa separação dos mesmos.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS METABÓLITOS DE SUCO DE LIMÃO TAHITI POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A fração orgânica do suco de limão Tahiti foi analisada por cromatografia líquida de ultra eficiência em modo reverso acoplada ao espectrômetro de massas *QqTOF-MS*, ou analisador por tempo de voo.

O método desenvolvido para as análises por LC–DAD serviu de base para orientar as análises por LC–MS/MS, com pequenas adaptações, devido a miniaturização da técnica cromatográfica quando acoplada à espectrometria de massas.

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tem sido amplamente utilizada para análises simultâneas de separação e identificação de flavonoides, em geral (ABAD-GARCÍA et al., 2012. WANG et al., 2017).

Primeiramente foi realizado a otimização do volume de injeção da amostra, a fim de obter boa intensidade do sinal (10^6), que possibilitasse a identificação dos compostos presentes na matriz. Duas concentrações do suco foram testadas: 5 e 15mg mL^{-1} , sendo a última selecionada, com volume ideal de injeção de $5\mu\text{L}$.

Duas abordagens foram utilizadas para a caracterização dos metabolitos presentes no suco. A primeira diz respeito a análise por abordagem de padrões, ou seja, foram realizados experimentos com padrões de ácidos orgânicos, flavonoides glicosilados e agliconas, comuns em *Citrus*, a fim de comparar o perfil de fragmentação e tempo de retenção desses com os compostos presentes no suco. Os padrões analisados foram: hesperidina, eriocitrina, narirutina, naringina, rutina, naringenina, quercetina, ácido cafeico e ácido gálico. Essas análises foram realizadas utilizando uma mistura dos padrões na concentração de $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada, e nas mesmas condições cromatográficas foram realizados experimentos de auto-MS/MS para o suco, em ambos os modos de ionização, positivo e negativo.

A segunda metodologia utilizada foi baseada na desreplicação de dados, com uma abordagem de perfil químico direcionado. Em que se buscou a identificação de outros metabolitos presentes no suco, além daqueles identificados por comparação com os padrões.

O conceito de desreplicação consiste num processo de triagem de extratos brutos, objetivando a identificação e caracterização de compostos já identificados na

literatura, mas sem a necessidade de isolamento (SPRENGER & AQUINO, 2015. HUBERT. NUZILLARD. RENAULT, 2017).

A caracterização dos compostos presentes no suco de limão Tahiti foi realizada pela análise dos íons precursores e seus fragmentos (íons produtos) em ambos os modos negativo (ESI^-) e positivo (ESI^+) (ANEXO 5) e em diferentes energias de ionização. Além disso, alguns compostos foram confirmados por comparação com os respectivos padrões ou, ainda, inferidos de acordo com as bases de dados *online* *MetFrag* e Pubmed, e com revisões da literatura.

4.3.1 Fragmentação de flavonoides glicosilados

Flavonoides glicosilados são os principais metabólitos encontrados em suco de *Citrus*, podendo ser O- ou C-glicosilados. As unidades de açúcares mais comumente encontradas em flavonoides de *Citrus* são: hexose (glucose) e desoxihexose (ramnose), podendo ser di-O-glicosilados (monossacarídeos ligados em diferentes posições do flavonoide) ou O-diglicosilados (dissacarídeos ligados entre si), para este último caso, a forma dissacarídica pode ser encontrada como neohesperidose ou rutinose (Figura 22) (WU et al., 2004. CUYCKENS. CLAEYS, 2004. ABAD-GARCÍA et al., 2012. LEDESMA-ESCOBAR. PRIEGO-CAPOTE. LUQUE DE CASTRO, 2015. GATTUSO et al., 2007).

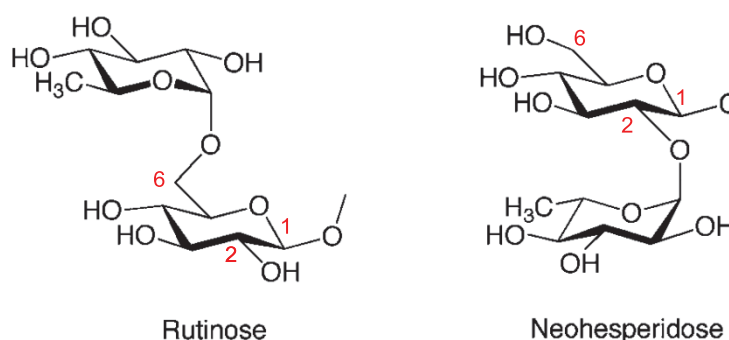


Figura 22. Rutinose e neohesperidose, isômeros constitucionais de posição, são O-diglicosídeos bastante comuns em *Citrus*. Fonte: Autor.

As fragmentações de flavonoides glicoconjugados são simbolizadas de acordo com nomenclatura introduzida por DOMON. COSTELLO, 1988 (Figura 23).

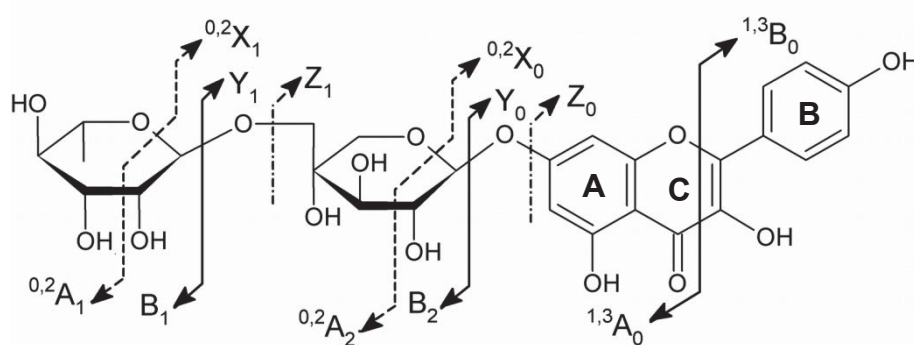


Figura 23. Notação para fragmentação de flavonoides glicosilados, representação em kaempferol-7-O-rutinosídeo. Adaptado de Ferreres *et al.*, 2004.

Os íons contendo a aglicona são denominados como:



j é o número de ligações interglicosídicas clivadas, contando a partir da aglicona.

k e l indicam as clivagens dentro do anel do açúcar.

Sendo que a ligação do açúcar com a aglicona é numerada como 0 (zero).

Se a carga permanece no resíduo de carboidrato os íons produtos são denominados como:



i indica o número (≥ 1) da ligação glicosídica quebrada, partindo do terminal não reduzido.

Os O-diglicosídeos fornecem íons Y_1 e Y_0 , os quais são formados a partir da reação de rearranjo das ligações interglicosídicas. Em baixa energia de fragmentação, flavonoides O-glicosídeos sofrem clivagem heterolítica entre as ligações O–C do hemi-acetal, gerando íons Y_1 . Enquanto que em maiores energias podem ocorrer clivagens intra-glicosídica, gerando os fragmentos ${}^{k,l}X_j$.

A quebra das ligações glicosídicas tem como mecanismo o rearranjo de hidrogênio do açúcar para o oxigênio glicosídico, seguido da clivagem heterolítica da ligação glicosídica do hemiacetal, o que leva a eliminação de resíduos de mono ou dissacarídeos. Podendo ser observado perdas neutras de 162u (glucose), 146u (ramnose), 132u (pentose) ou ainda 176u (ácido urônico) (MA et al., 2000. FERRERES. LLORACH. GIL-IZQUIERDO, 2004. CUYCKENS. CLAEYS, 2004. DE OLIVEIRA et al., 2017).

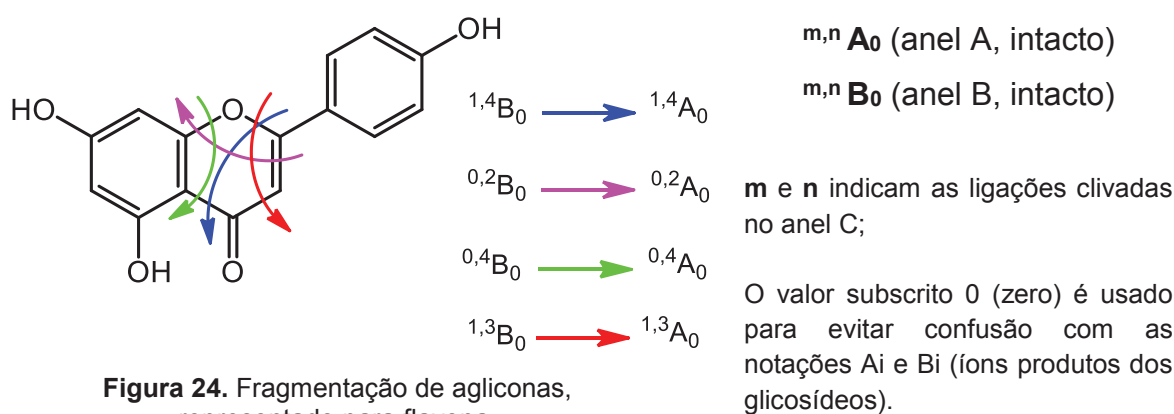
Possibilitando, assim, a determinação da sequência dos carboidratos, os quais podem ser calculados pela diferença de m/z a partir do íon precursor e dos fragmentos correspondentes a X_i , Y_i e Z_i .

A localização das unidades glicosídicas em flavonoides é variável, sendo as posições mais comuns C₃ (anel C), C₇ (anel A), podendo ser mono- ou di-glicosídeos (em posições diferentes ou ligados entre si).

Para flavonoides 3- e 7-O-glicosilados, no modo negativo, ocorre a formação de íons radical ($Y_0 - H$)^{•-} com elevada abundância, devido a clivagem homolítica da ligação açúcar-aglicona. Esse íon é mais comum em flavonas e flavonóis, devido a presença da ligação dupla em C₂ – C₃ no anel C. Sendo que para flavonoides 4'-O-glicosilados o íon Y_0^- tem sido encontrado como mais intenso. Entretanto, a razão dos íons ($Y_0 - H$)^{•-} → Y_0^- é variável e depende da posição de substituintes, como grupos hidroxila (OH), acetila e glucosídeos no esqueleto da aglicona, bem como do padrão de hidroxilação do anel B e a posição dos resíduos glicosídicos (HVATTUM. EKEBERG, 2003. FERRERES. LLORACH. GIL-IZQUIERDO, 2004).

4.3.2 Fragmentação de flavonoides agliconas

Para os íons fragmentos resultantes da aglicona, a nomenclatura foi adotada de acordo com Ma *et al.* 1997 (Figura 24).



A clivagem do anel C ocorre pelo mecanismo de *Retro-Diels Alder* (RDA), levando a formação dos íons $m,n A_0$ e $m,n B_0$, o que fornece informação sobre o número e tipo de substituintes nesses anéis. Os anéis intactos são representados por **A** e **B** (FABRE *et al.*, 2001).

Outros fragmentos muito comuns são: perda neutra de 15u representa a eliminação radicalar de CH₃, pela quebra da ligação O–C em clivagem homolítica. perda de hidroxila na forma de H₂O (18 u), CO (28 u), C₂H₂O (42 u) e CO₂ (44 u).

Em geral, os fragmentos obtidos são típicos para cada subclasse de flavonoides e podem fornecer informações importantes para a caracterização destes metabólitos.

Flavonas, em geral, apresentam perda neutra de CO (28u) e CO₂ (40u), relacionadas primeiramente ao anel C, seguido do anel A. Para flavonas com grupo metila, o fragmento mais comum é (M-H-CH₃)^{-•} (radical), além do íon correspondente a aglicona. Enquanto que grupos hidroxilas em C₃ de flavonol resulta em mais e diferentes possibilidades de fragmentação, quando comparadas com flavonas (CUYCKENS. CLAEYS, 2004).

Tabela 12. Flavonoides identificados no suco de limão Tahiti (*Citrus latifolia*), analisado por LC-ESI-Qq-TOF.

Substâncias identificadas por comparação com padrão									
Nº	Composto	Fórmula Molecular	t _R *	Massa exata / teórica	(M-H) ⁻ / (M+H) ⁺	Íons produtos (M-H) ⁻	Erro de Massa (ppm)	UV	Anexo
1	Rutina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	14,3 20,0	609,1459	609,1461 611,1648	300/301. 271. 255. 179. 151	0,4	255. 353	Anexo 6
2	Hesperidina	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	17,8 23,9	609,1819 611,1642	609,1825 611,1647	301. 286. 257. 242. 151. 134	1,0 -0,9	284. 220	Anexo 7
3	Eriocitrina	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	13,7 19,6	595,1670	595,1668 597,1829	459. 287. 151	-0,2	284. 225	Anexo 8
4	Naringina	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	16,0 22,1	579,1719 581,1900	579,1709 581,1890	313. 271. 151	1,8 1,7	282. 213	Anexo 9

* O primeiro tempo de retenção (t_R) é referente aos experimentos realizados para as análises com padrão.
O segundo t_R é referente aos experimentos realizados para as análises por desreplicação.

Substâncias inferidas por desreplicação									
5	Diosmina ou neodiosmina	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	23,4	607,1668	607,1657 609,1821	299. 284. 255. 151	1,9	340. 284. 230	Anexo 10
6	Apigenin-7-O-rutinoside ou neohesperidose				577,1550 579,1709	269. 151			Anexo 11
7	Vitexin 2"-O-rhamnoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	22,7	577,1563	579,1709	431. 341. 389. 269	2,3		Anexo 12
8	Vicenina-2		15,7		593,1501 595,1674	503. 473. 383. 353	1,9	270. 332	Anexo 13
9	Luteolina 7-O-rutinoside ou neohesperidose	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	20,5	593,1512	593,1494 595,1650	285. 459. 151	3,1	270. 253	Anexo 14

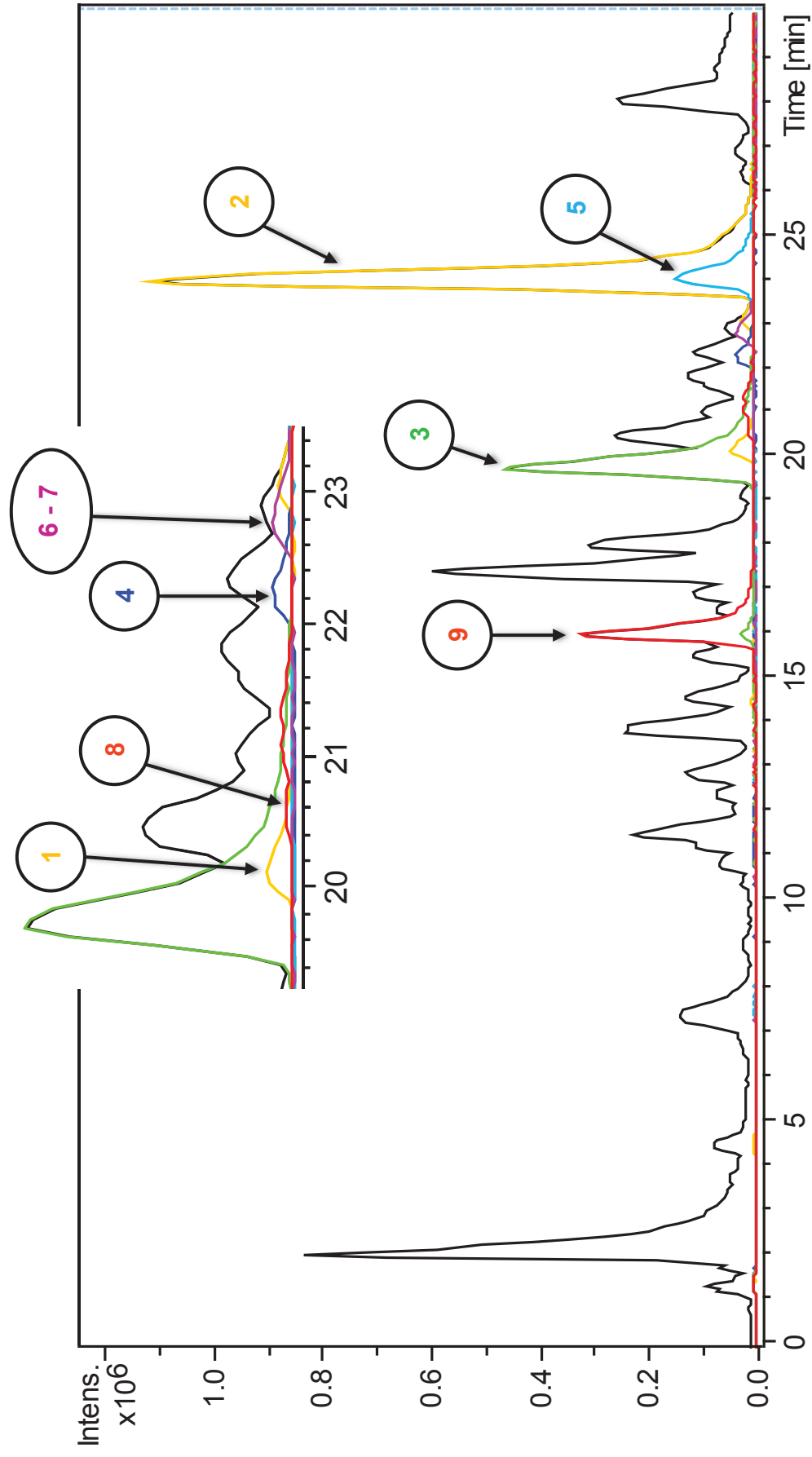


Figura 25. Cromatograma com os compostos identificados e inferidos para o suco de limão Tahiti por LC-MS/MS, modo ESI⁻.

4.4 ANÁLISE DA FRAGMENTAÇÃO DOS PADRÕES DE FLAVONOIDES

Os espectros dos padrões de flavonoides avaliados foram adquiridos em ambos os modos ESI⁻ e ESI⁺, juntamente com o espectro no ultravioleta. Uma solução contendo mistura de 50 µg mL⁻¹ de cada padrão: hesperidina, eriocitrina, narirutina, naringina, rutina, naringenina, ácido cafeico e ácido gálico, foi analisada nas mesmas condições que o suco de limão Tahiti.

Uma vez que os espectros no modo negativo (ESI⁻) apresentaram melhores resultados quanto à ionização e intensidade dos sinais, as propostas de mecanismos de reação aqui apresentadas serão para esse modo. Entretanto, as atribuições foram confirmadas também no modo positivo e pelos experimentos de variação de energias de colisão, para ambos os modos.

Os dados para cada composto estão descritos na Tabela 12.

4.4.1 Rutina e Hesperidina

Ambos os compostos hesperidina (hesperitina-7-O-rutinosídeo) (**1**) e rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) (**2**) (Figura 25) apresentam massa exata muito semelhante, embora diferente fórmula molecular: C₂₈H₃₄O₁₅ (610,1892 g mol⁻¹) e C₂₇H₃₀O₁₆ (610,1528 g mol⁻¹), respectivamente. A correta identificação destes compostos foi realizada comparando as massas exatas, o padrão de fragmentação e tempo de retenção.

Hesperidina (t_R = 17,8 min) apresenta maior interação em fase reversa, sendo eluída posteriormente à rutina (t_R = 14,3 min), devido a presença do grupo metila no anel B ao invés do grupo hidroxila presente na rutina.

Embora ambas apresentem a mesma unidade glicosídica (rutinose), a posição em que essas unidades estão ligadas às agliconas são diferentes: hesperidina (hesperitina-7-O-rutinosídeo) e rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo). Considerando, ainda que, embora diferentes, as agliconas também apresentam massa exata muito semelhante: 302,0707 e 302,0343, respectivamente.

Entretanto, devido a diferença de classes de flavonoides, sendo rutina um flavonol e hesperidina uma flavanona, o padrão de fragmentação de ambas é muito diferente.

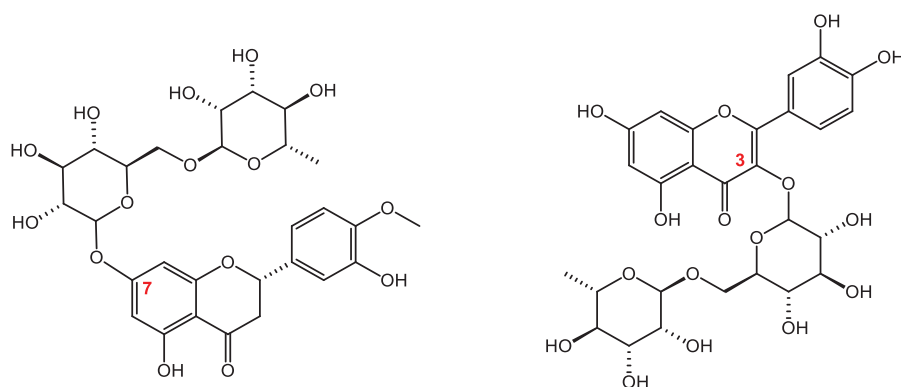
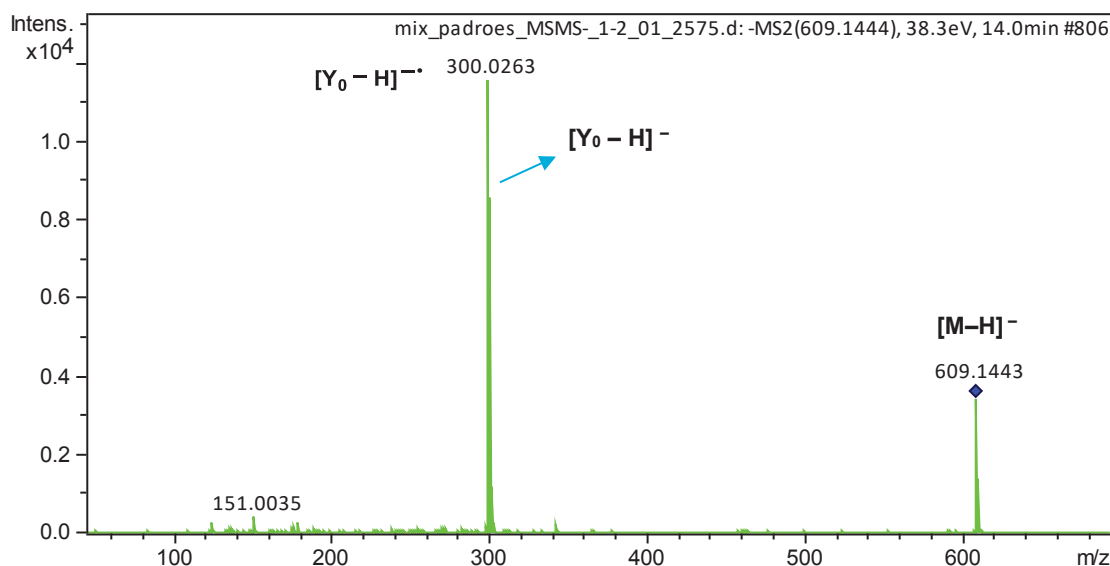


Figura 26. Estrutura química de hesperitina-7-O-rutinosídeo (esquerda) e quercetina-3-O-rutinosídeo (direita).

Rutina (m/z 609,1443), modo ESI⁻ (38 eV), apresentou como pico base (m/z 300,0263), referente à fragmentação homolítica do íon aglicona. Além disso, o íon da quebra heterolítica também foi observado m/z 301,0333. Outros fragmentos, a partir da aglicona e característicos de flavonol-3-O-glicosilados, foram: m/z 271,0227, referente à perda de CO (29u) e m/z 255,0286 referente à perda de CO₂ (45u). além dos fragmentos relativos à RDA: $^{1,2}A_0^-$ e $^{1,3}A_0^-$ (Figura 26 e 27).



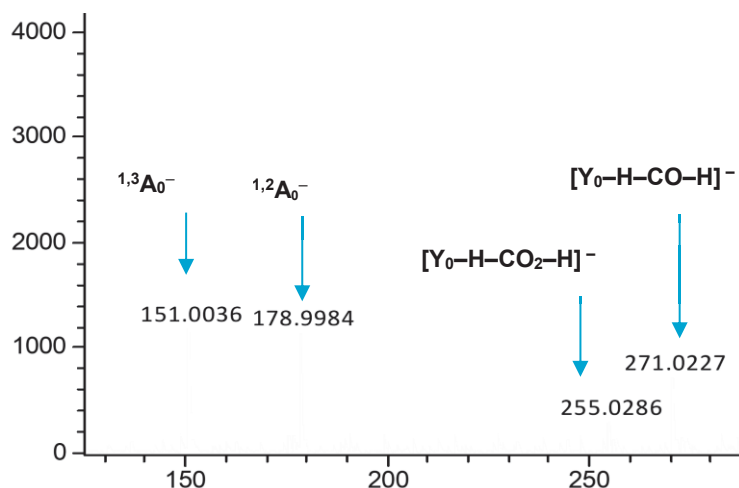


Figura 27. Espectro de ESI⁻ e ampliação (38 eV) de rutina m/z 609,1443.

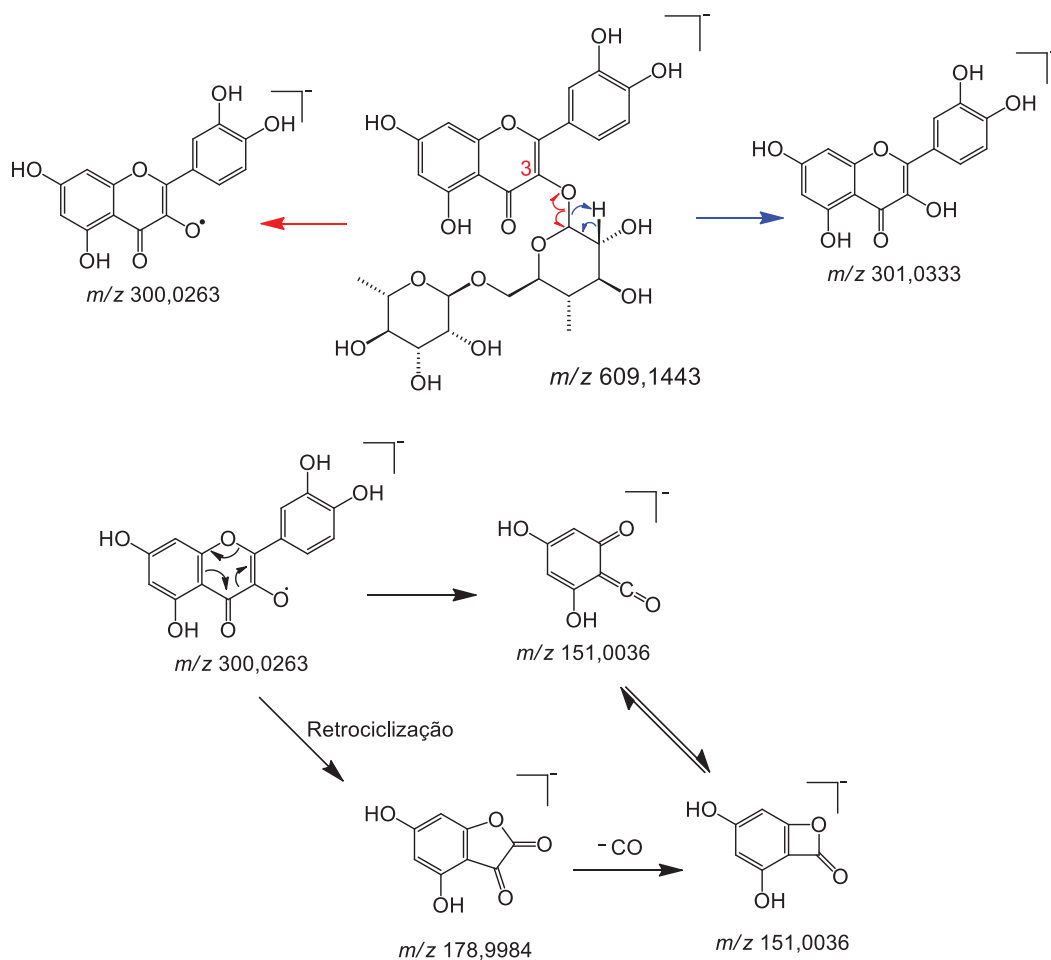


Figura 28. Proposta de mecanismo de fragmentação para rutina, ESI⁻.

Hesperidina (m/z 609,1809), modo ESI⁻ (38 eV), apresentou unicamente o fragmento do pico base, referente ao íon fragmento aglicona (m/z 301,0708).

Entretanto para os espectros adquiridos com energias de 50 e 60 eV foi possível obter muitos fragmentos da aglicona, como o íon referente a perda de metila radicalar m/z 286,0482. perda neutra de CO (28u), resultando no íon m/z 257,0820. perda neutra de CO₂ referente ao íon m/z 242,0582. bem como o íon 151,0037 proveniente da fragmentação via RDA. entre outros (Figuras 28 e 29).

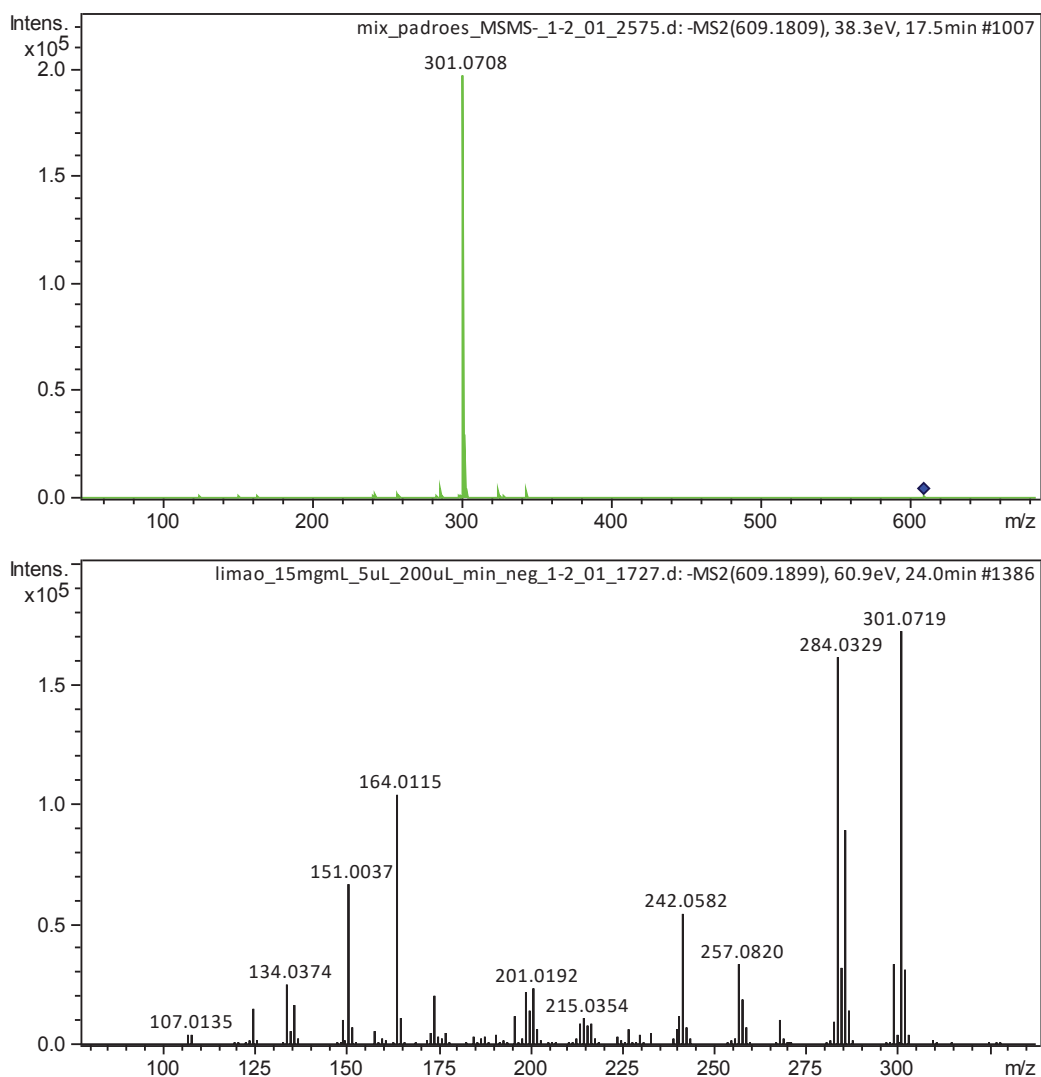


Figura 29. Espectros de ESI⁻ (38eV, acima, referente aos padrões) e ESI⁻ (60eV, abaixo, referente a desreplicação) de hesperidina m/z 609,1809.

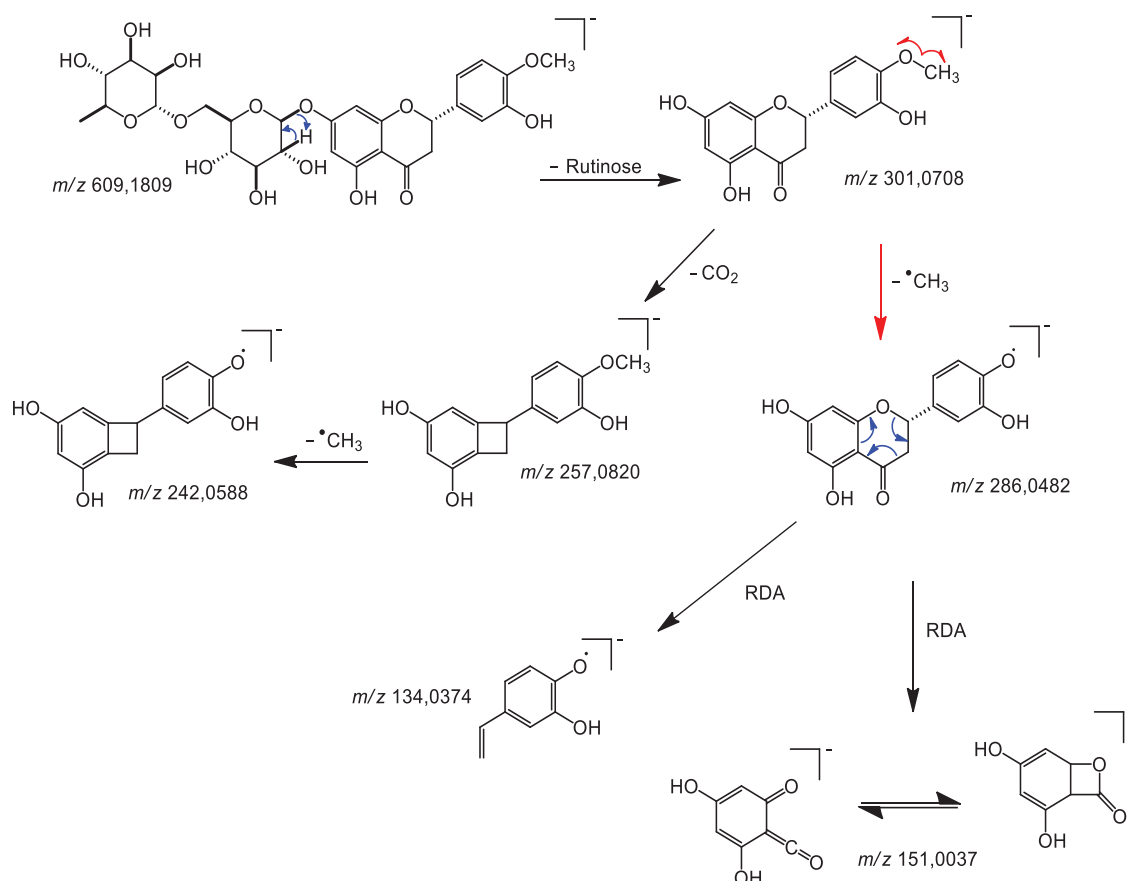


Figura 30. Proposta de mecanismo de fragmentação para hesperidina, ESI⁻.

Para flavonoides glicosilados, dependendo da estrutura, no modo ESI⁻ são produzidos os dois tipos de fragmentos da aglicona: homolítico e heterolítico.

Em estudo realizado por Hvattum & Ekeberg (2003) o grau de fragmentação do íon produto de radical aglicona (clivagem homolítica) de flavanonas glicosiladas, na forma desprotonada ESI⁻, foi estudado usando padrões de eriocitrina e hesperidina. A fragmentação por CID para esses compostos produziu somente o fragmento referente a quebra heterolítica das agliconas, m/z 287 (eriocitrina) e m/z 301 (hesperidina). O que leva a deduzir que, nas flavanonas, o fato de não apresentarem a ligação dupla ($\text{C}_2\text{--}\text{C}_3$), no anel C, próximo à carbonila (C_4), não apresenta estabilidade suficiente para a formação de fragmentos homolíticos da aglicona. Entretanto, para flavonóis, os quais apresentam a ligação dupla $\text{C}_2\text{--}\text{C}_3$, esses fragmentos são observados, como é o caso da rutina, para a qual foi observado o íon m/z 300,0263. referente à clivagem homolítica.

Avaliando os espectros no ultravioleta para rutina são observadas duas bandas máximas: 255 e 353 nm, caracterizando o esqueleto de flavonol. Enquanto que para hesperidina mostrou uma banda 284 nm e um “ombro” em 220 nm.

4.4.2 Eriocitrina

O espectro de massas para o padrão de eriocitrina (**3**) mostrou o íon precursor m/z 595,1618 (ESI⁻), referente ao pico em t_R = 13,7 minutos. Tendo como pico base o íon aglicona m/z 287,0527. Outros íons observados foram, m/z 459,1142, referente a perda neutra de 136u correspondendo ao fragmento por RDA $^{1,3}B_0^-$. No modo ESI⁺ (27 eV) observa-se o íon m/z 451,1228, o que caracteriza perda neutra de 146, referente a unidade de ramnose (ANEXO 8). Observa-se, também, o íon m/z 151,0022 ($^{1,3}A_0^-$), referente à clivagem do tipo RDA (Figuras 30 e 31).

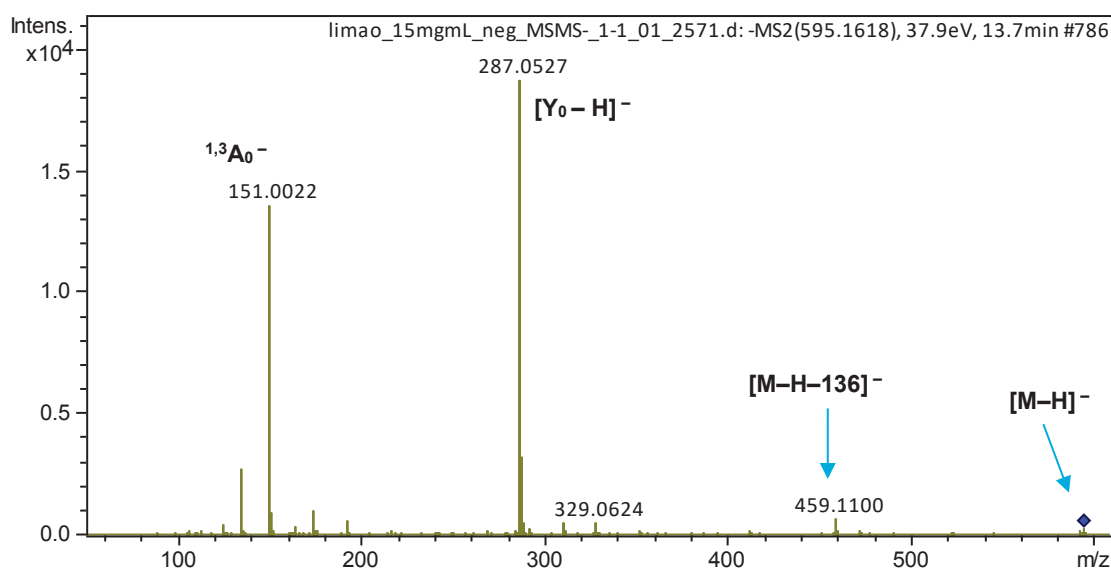


Figura 31. Espectro de ESI⁻ (acima) e ESI⁺ (abaixo) (37eV) de eriocitrina m/z 595,1618 e 597,1845, respectivamente.

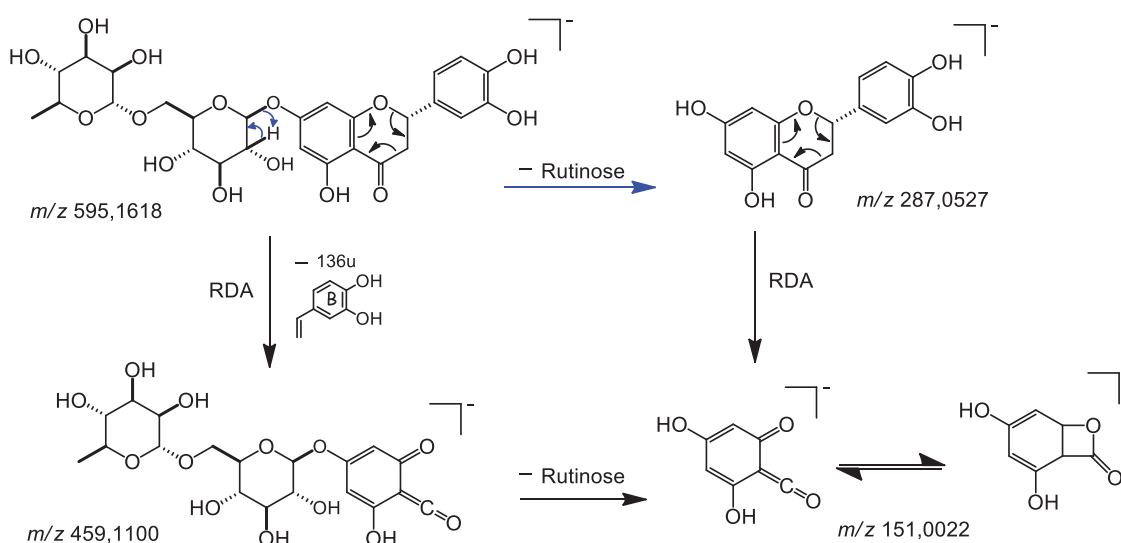


Figura 32. Proposta de mecanismo de fragmentação para eriocitrina, ESI⁻.

O espectro no UV para eriocitrina mostrou uma banda em 284 nm e um “ombro” em 225 nm.

4.4.3 Naringina e Narirutina

Neohesperidose (ramnose-(1-2)-glucose) e rutinose (ramnose-(1-6)-glucose) são diglicosídeos e isômeros constitucionais de posição muito encontrados em *Citrus*. Embora a única diferença entre eles seja a posição da ligação interglicosídica (1→2 ou 1→6) (Figura 32), os dados de fragmentação podem cooperar para essa diferenciação.

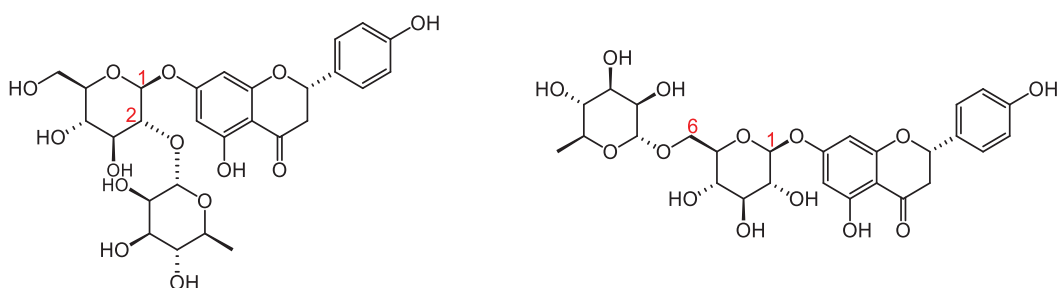


Figura 33. Naringina neohesperidose (1→2) (esquerda) e narirutina rutinosídeo (1→6) (direita).

O padrão de fragmentação obtido para naringina e narirutina foi muito semelhante, em ambos os modos de ionização.

Para a naringina (**4**) (m/z 579,1705), t_R = 15,8 min, o espectro de massas apresentou íon relativo a perda neutra de 308u, referente ao dissacarídeo neohesperidose, gerando o pico base em m/z 271,0607, referente a aglicona. Outro íon observado foi o m/z 313,0717, resultando em perda neutra de 266u, o qual foi atribuído ao fragmento gerado pela perda neutra de ramnose (146u) mais o fragmento $^{1,3}B_0$ (120u) gerado pelo mecanismo de RDA. Os espectros e mecanismo proposto podem ser observados nas Figuras 33 e 34.

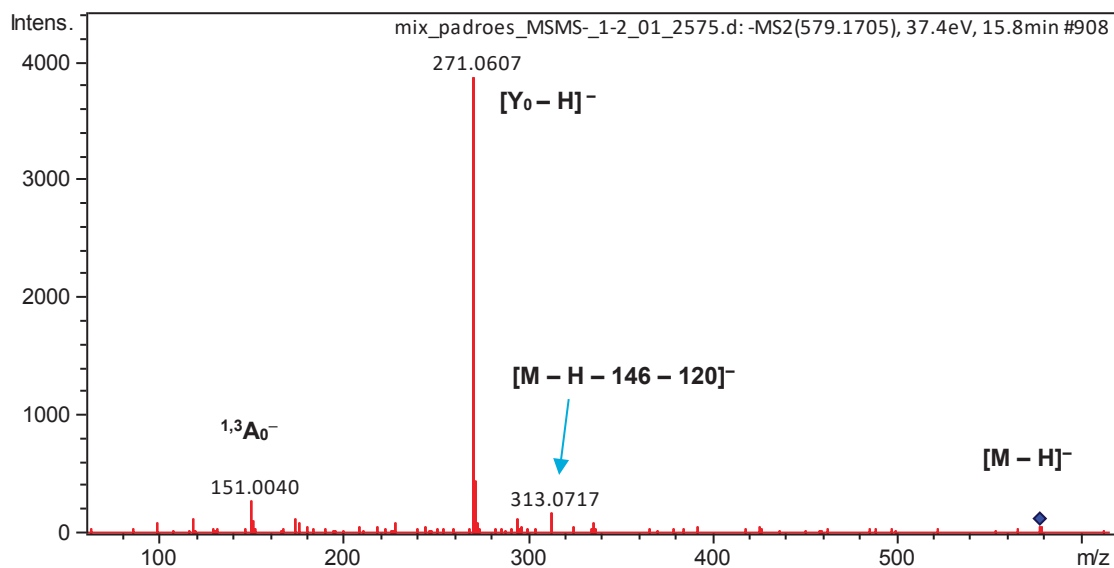


Figura 34. Espectro de ESI⁻ (37eV) de naringina m/z 579,1705.

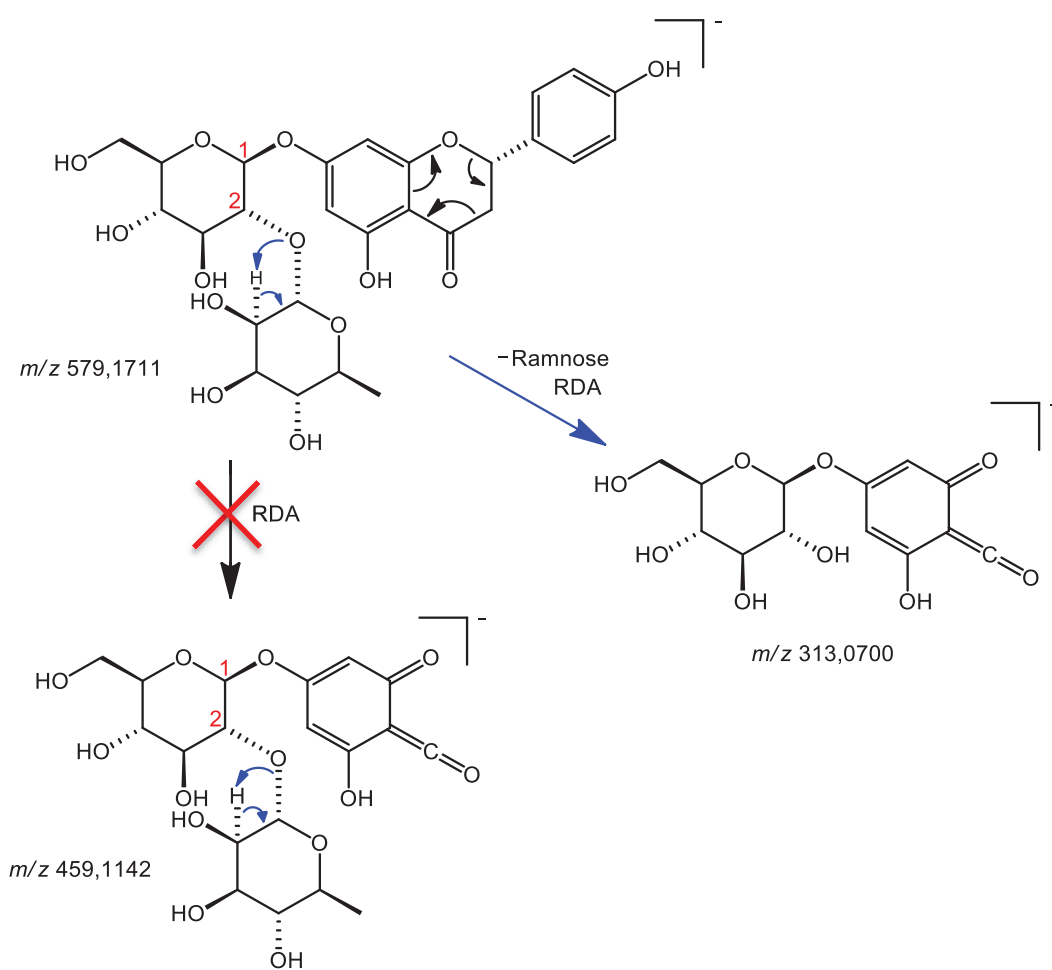


Figura 35. Proposta de fragmentação para naringina, neohesperidose (1→2), modo ESI⁻.

Para narirutina (m/z 579,1711) ($tr = 17,0$) em modo ESI⁻, foram observados os mesmos fragmentos que naringina e uma diferença bastante significativa, a presença do íon fragmento m/z 459,1142, referente a perda neutra do fragmento $^{1,3}B_0$ (120u), resultante do mecanismo de RDA (Figuras 35 e 36).

Para naringina o íon m/z 459, foi encontrado numa intensidade muito baixa, quase imperceptível.

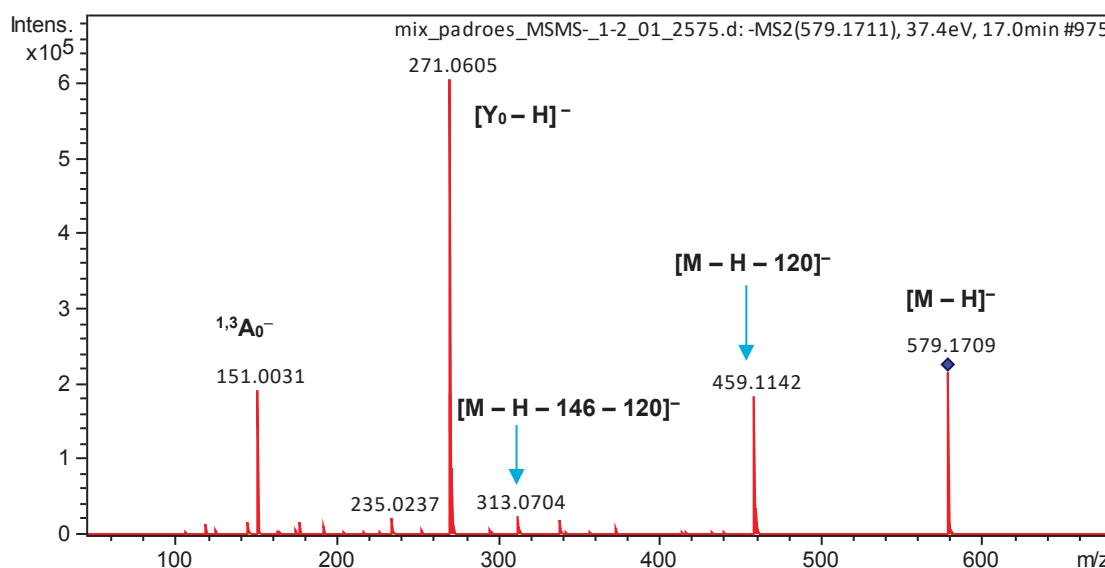


Figura 36. Espectro de ESI⁻ (37eV) de narirutina m/z 579,0605.

Na literatura tem sido proposto que para O-neohesperidose (1→2) dois principais íons fragmentos são formados: Z_1^- ($M - 164 - H$)⁻ e Y_0^- ($M - 308 - H$)⁻, enquanto que apenas Y_0^- é observado para O-rutinese (1→6). Para ambos o íon Y_0^- é o pico base. Entretanto essas considerações devem ser bastante criteriosas, uma vez que, diferentes parâmetros de análise, principalmente diferentes energias de colisão, podem causar variações tanto no padrão de fragmentação, quanto nas intensidades dos íons fragmentos (CUYCKENS, CLAEYS, 2004. KACHLICKI et al., 2016).

De acordo com experimentos realizados no modo ESI⁺, em baixa energia de CID, uma maior razão Y_0^+/Y_1^+ é obtida para os isômeros contendo neohesperidose (1→2). Sendo a eliminação do dissacarídeo 1→2 facilmente promovida devido ao fator estérico (MA et al., 2000. MA et al., 2001).

Em nossos experimentos não foram observados íons Y_1^+ ou Z_1^- .

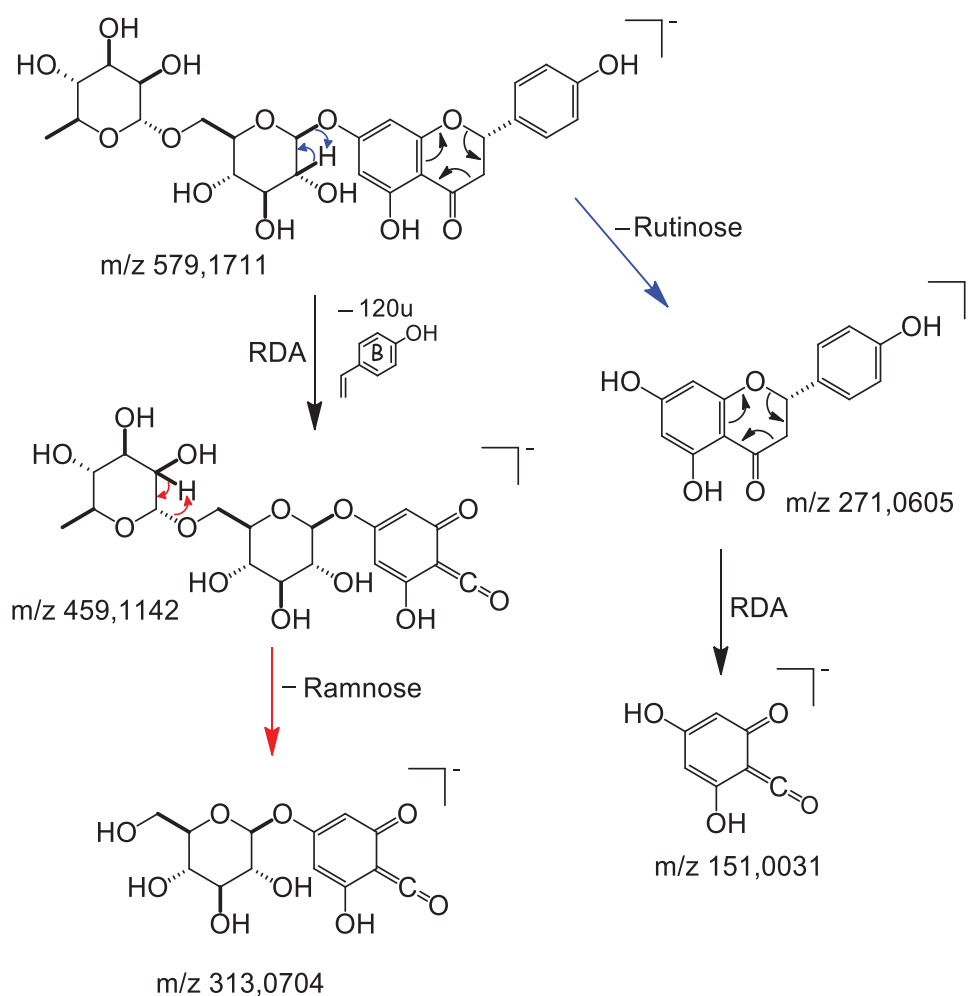


Figura 37. Proposta de fragmentação para narirutina, rutinosídeo (1→6), modo ESI⁻.

A ausência do fragmento m/z 459 para o composto naringina (1→2), pode ser justificada pelo maior impedimento estérico em comparação ao composto narirutina (1→6), levando direto ao fragmento m/z 313. Sendo que esse mesmo padrão de fragmentação foi encontrado para a eriocitrina, sendo essa também uma flavanona 7-O-glicosilada (1→6) (rutinosídeo), corroborando para a proposta de fragmentação apresentada.

Os espectros no UV para ambas foram idênticos, apresentando duas bandas: 283 nm e 213 nm.

Avaliando o padrão de fragmentação, bem como tempo de retenção, dos padrões de flavonoides glicosilados estudados, foram identificados no suco de limão Tahiti, os seguintes flavonoides: hesperidina, eriocitrina, rutina e naringina.

Das agliconas e ácidos fenólicos avaliados nenhum foi encontrado no suco de limão Tahiti (ANEXOS 15 e 16).

4.5 SUBSTÂNCIAS INFERIDAS POR DESREPLICAÇÃO

Tendo como base os dados de fragmentação, tempo de retenção e espectros no UV obtidos para os padrões acima avaliados, foi realizada abordagem por desreplicação e, assim, foi possível inferir a presença de outros compostos no suco de limão. Os compostos foram inferidos por comparação com a literatura e o banco de dados criado por CERQUEIRA, 2016, o qual constitui uma lista completa dos metabólitos identificados na literatura para o gênero *Citrus*.

4.5.1 Substância m/z 608,1741 ($C_{28}H_{32}O_{15}$)

A análise da banda cromatográfica em $t_r = 23,4$ min, apresentou m/z 607,1751 (ESI^-) e m/z 609,1819 (ESI^+) para o íon molecular. Em pesquisa na literatura para compostos identificados em suco de *Citrus*, esses íons moleculares observados foram relacionados com os flavonoides 7-O-glicosilados: chrysoeriol-7-O-rutinese/hesperidose e diosmina (rutinose) ou neodiosmina (hesperidose) (Figura 37). ambas as flavonas com massa exata calculada para m/z 608,1741 ($C_{28}H_{32}O_{15}$), o que leva a uma diferença de massa de 1,0 mDa comparando com a massa experimental observada.

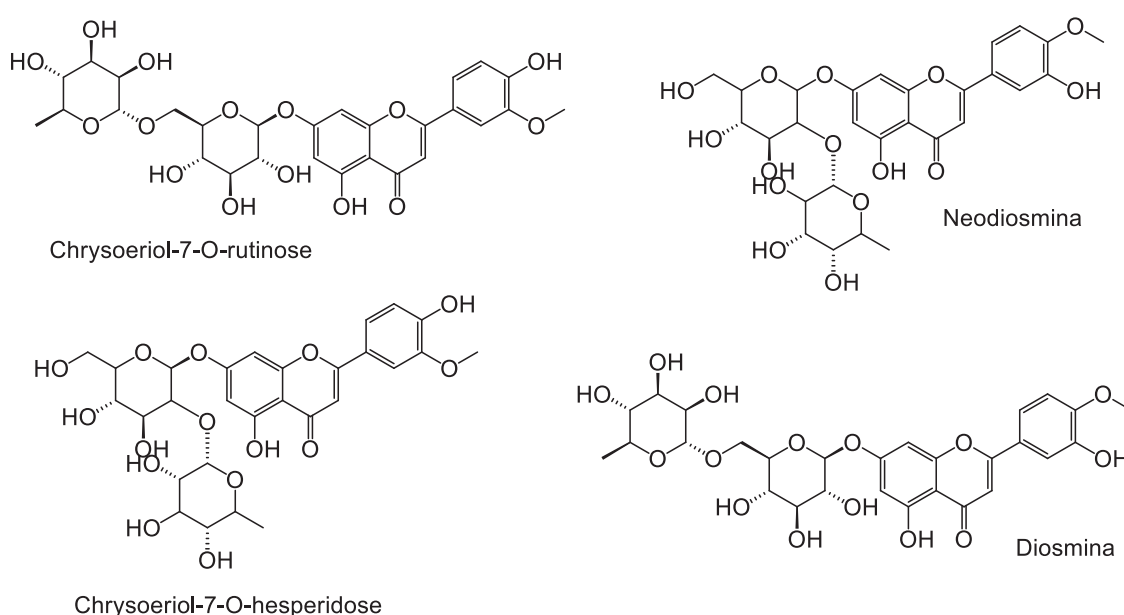


Figura 38. Estruturas das possíveis flavonas O-7-glucosídeo, encontradas em *Citrus*, para m/z 608,1736 Da.

A proposta de identificação levou em conta os fragmentos gerados para m/z 607,1751 (ESI⁻), em diferentes energias de ionização. O pico base, (37eV) m/z 299,0556, relativo ao íon aglicona (diosmetina), decorrente da perda neutra de 308u, indicando a presença de rutinosídeo ou neohesperidosídeo, ligado a aglicona. Além disso, no modo ESI⁺, o íon m/z 463,1232, corroborou com essa proposta já que ele representa a perda do fragmento de ramnose (146u) (ANEXO 10).

Outro fragmento bastante intenso, encontrado como pico base nos espectros obtidos em energias de fragmentação mais altas (38 eV), foi o íon o m/z 301,0713. Em trabalho realizado por LIN. HARNLY, 2010, os isômeros de diosmina (rutinose e neohesperidose) foram identificados por análise de padrões e os fragmentos encontrados para ambas as substâncias foram: 463, 301/299 e 284. Enquanto que para chrysoeriol-7-O-neohesperidoside não foi encontrado o fragmento 301, apenas 299 e 284 (BRITO et al., 2014).

Outro fragmento observado foi o íon m/z 284,0314 (52 eV), o qual se refere a clivagem da metila da aglicona. E em energias mais altas foram observados, ainda, os fragmentos típicos da clivagem da aglicona, como o íon m/z 255,0307, relativo a perda neutra de CO a partir do íon m/z 284. bem como o m/z 151,0030, relativo ao fragmento $^{1,3}A_0^-$ (Figuras 38 e 39).

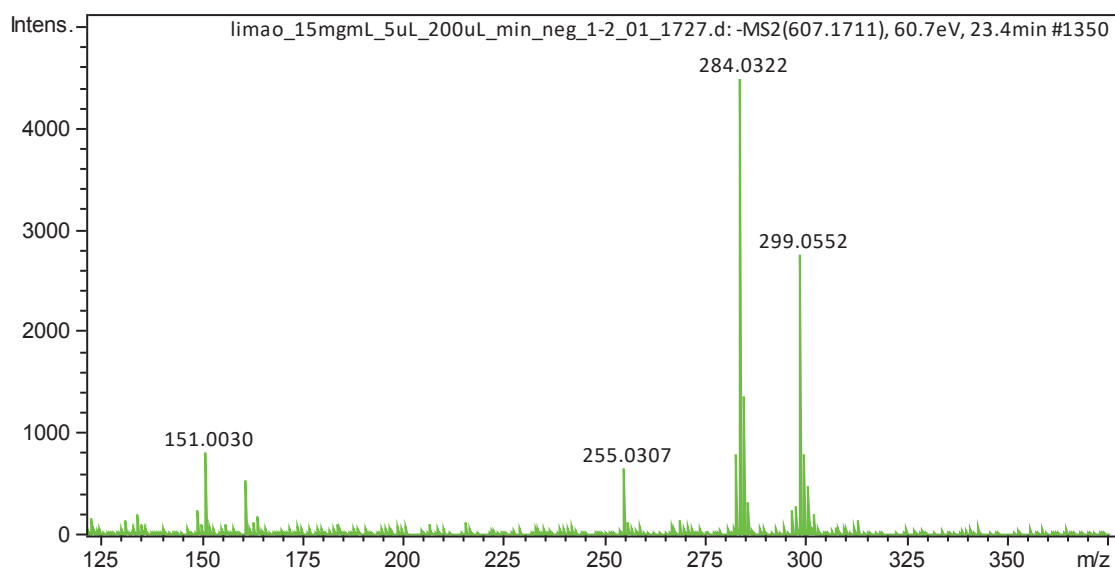
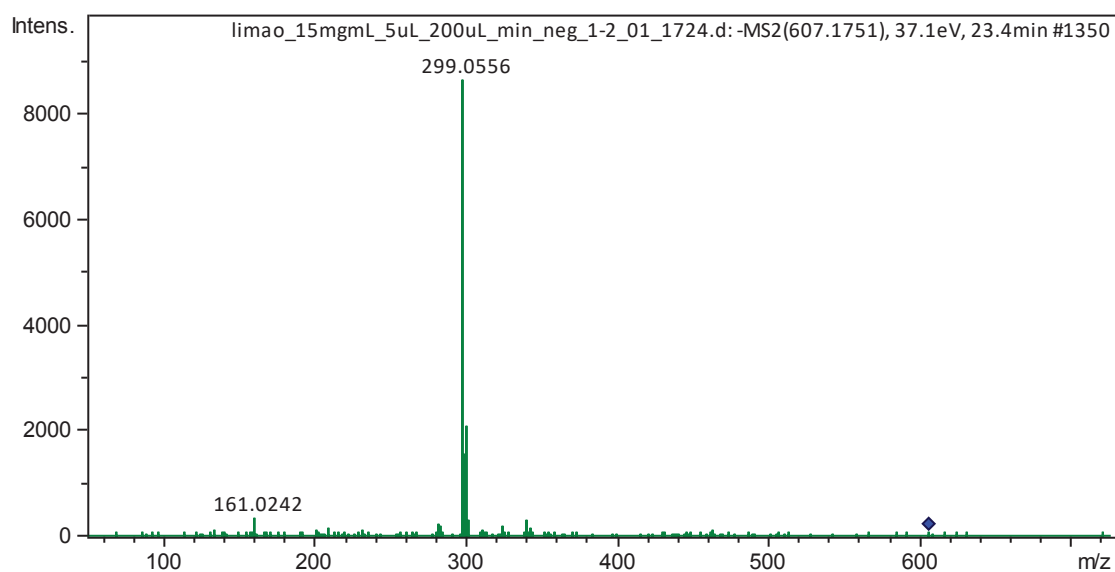


Figura 39. Espectros de ESI⁻ com 37eV (acima) e 60eV (abaixo) para flavona O-7-glucosídeo m/z 607,1751.

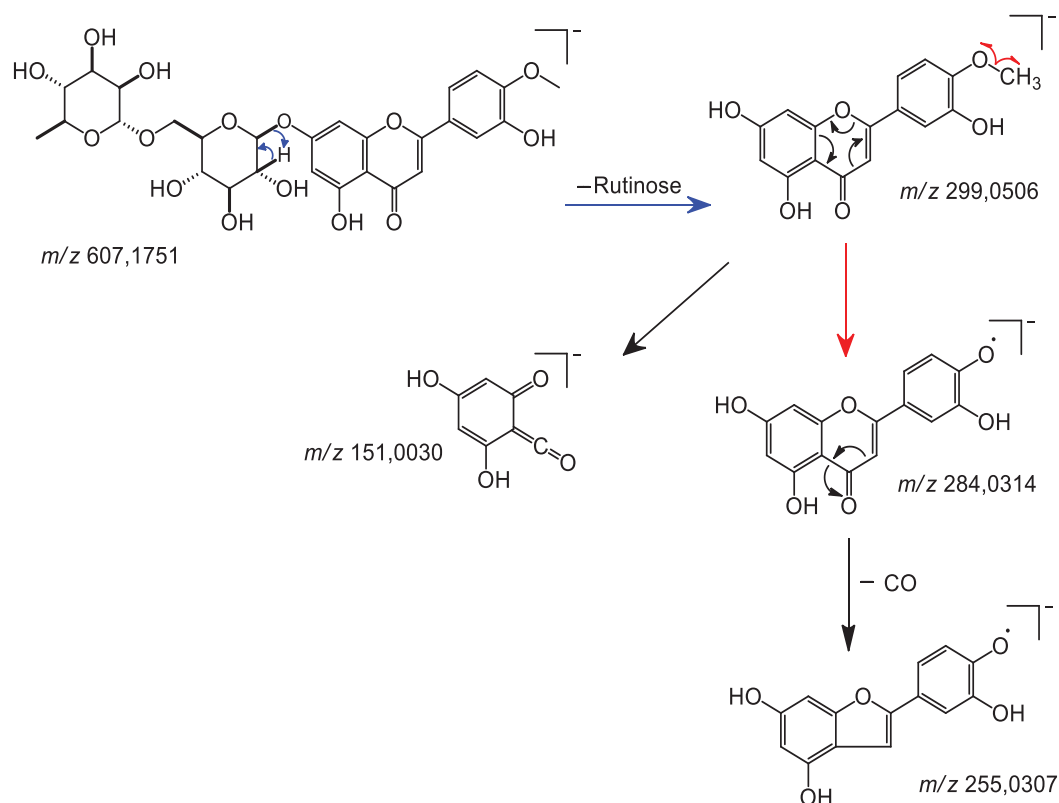


Figura 40. Proposta de fragmentação para m/z 607,1751, modo ESI⁻.

Diante disso, pode-se sugerir que o composto aqui investigado se trata de diosmetina (aglicona) 7-O-rutinose/hesperidose. Diosmina já foi encontrada em suco de *Citrus limon*, *C. reticulata*, *C. unshiu*, *C. aurantium*, *C. clementina*, *C. sinensis*, *C. aurantifolia* e *C. bergamia*, enquanto que neodiosmina foi relatada apenas para suco de *C. sinensis* e *C. bergamia*.

Conforme já relatado, em estudo realizado por Nogata *et al.*, 2006, diosmina foi identificada no suco de limão Tahiti (*C. latifolia*), enquanto que neodiosmina não. Sendo essa última encontrada nas outras partes do fruto apenas.

4.5.2 Substância m/z 578,1630 ($C_{27}H_{30}O_{14}$)

Analisando a banda cromatográfica em $t_r = 22,7$ min, com m/z 577,1616 (ESI⁻) e m/z 579,1709 (ESI⁺) para o íon molecular, e através de pesquisa na literatura para compostos identificados em frutos e suco de *Citrus*, esses fragmentos foram relacionados com flavonoides O/C-diglicosilados: apigenin-8-C-glucosil-2''-O-rhamnoside (vitexin 2''-O-rhamnoside), isorhoifolin (apigenin-7-O-rutinoside), rhoifolin (apigenin-7-O-neohesperidose) (Figura 40). As estruturas de flavonas, cuja massa

exata calculada é m/z 578,1630 ($C_{27}H_{30}O_{14}$), mostrou diferença de massa de 1,4 mDa comparando com a massa experimental observada.

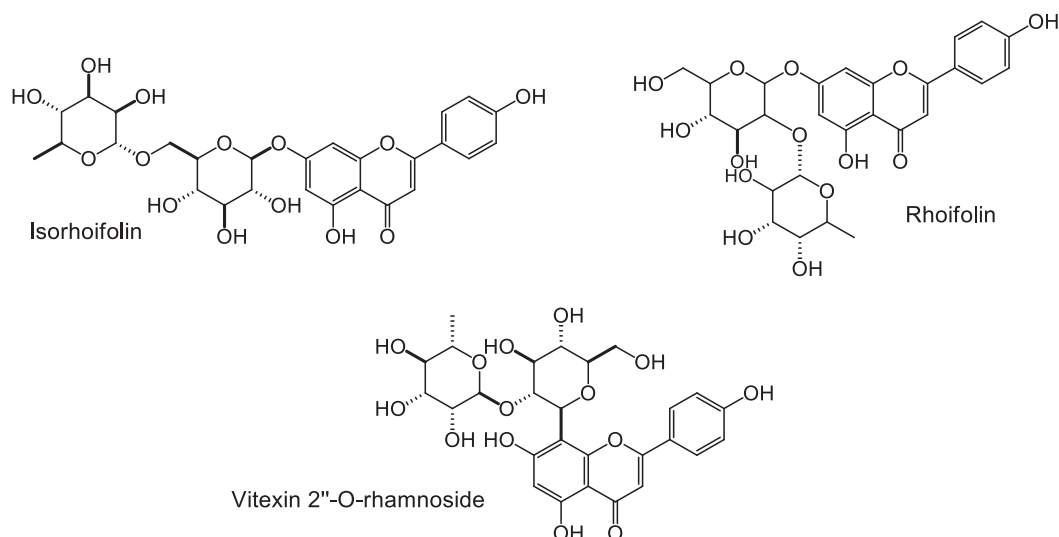


Figura 41. Estruturas de flavonas propostas para m/z 578,1630 Da, encontrados em suco de *Citrus*.

Os espectros de massas obtidos para m/z 577,1608 (ESI^-) mostraram fragmentos característicos de flavona-O-diglicosídeo. No espectro no modo ESI^- (57 eV), o pico base o íon m/z 269,0446, condizente com a aglicona pela perda neutra de 308u, rutinosídeo. O fragmento m/z 151,0051 é proveniente da clivagem RDA (Figuras 41 e 42) e no espectro no modo ESI^+ (24eV) foi observado o íon m/z 433,1129, relativo a perda neutra de ramnose (ANEXO 12).

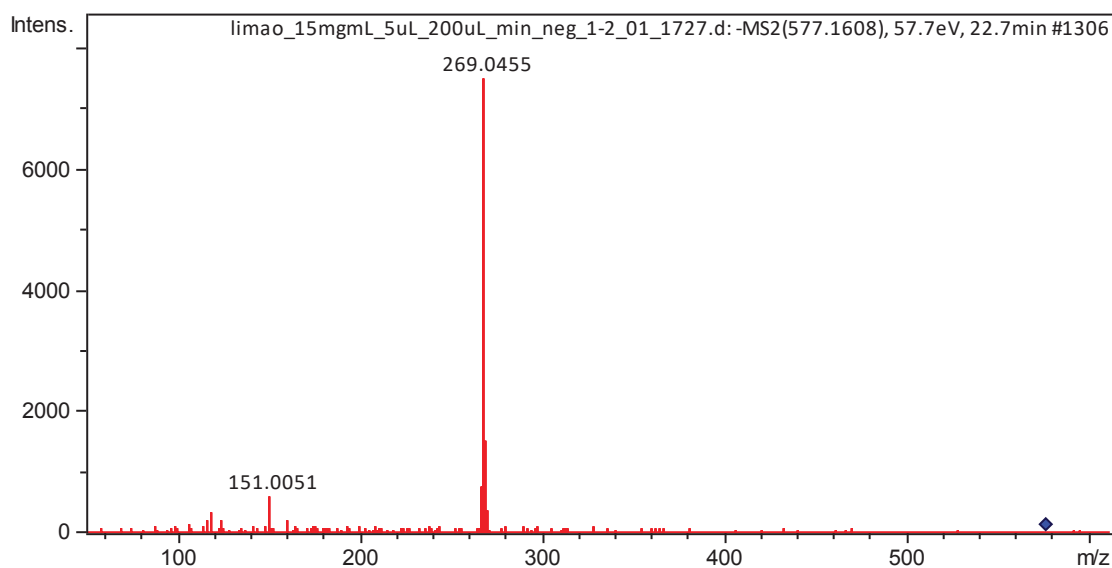


Figura 42. Espectro de ESI^- (57eV) para flavona O-7-glucosídeo m/z 577,1508.

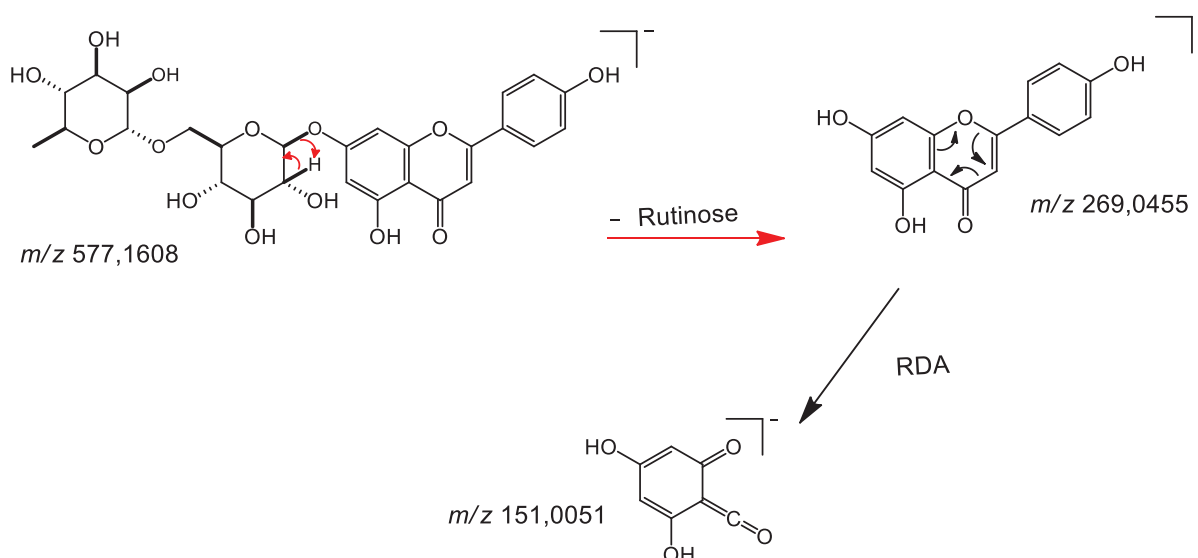


Figura 43. Proposta de fragmentação para O-flavona m/z 577,1608, modo ESI⁻.

Entretanto, em energias mais baixas (23 eV) alguns fragmentos específicos de C-rutinosídeo são observados, como o fragmento m/z 431,1853, caracterizando a perda da unidade de ramnose (146u), seguido de perda neutra de 90u, confirmado pela presença do íon m/z 341,1372. Outro fragmento identificado foi m/z 389,1766, a partir do m/z 431, caracterizando perda neutra de 42u, para o qual foi proposto clivagem referente a C_2H_2O , conforme proposto por FABRE *et al.*, 2001. Além disso, há uma diferença de 120u entre 389 e 269, o que indica a fragmentação de C-glucose (Figura 43), sendo que nesse caso, o íon 269 não é referente ao íon aglicona (Figura 45).

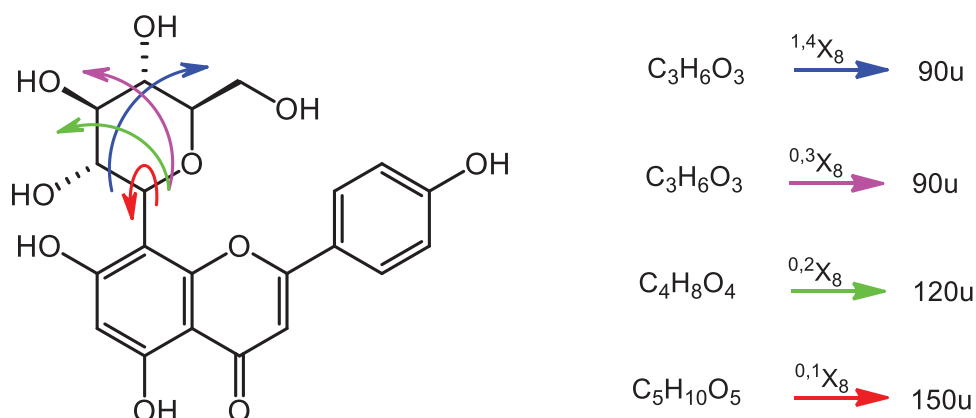


Figura 44. Fragmentações características de flavonoide C-glicosilado, indicando o número das ligações clivadas e perda neutra. Fonte: autor.

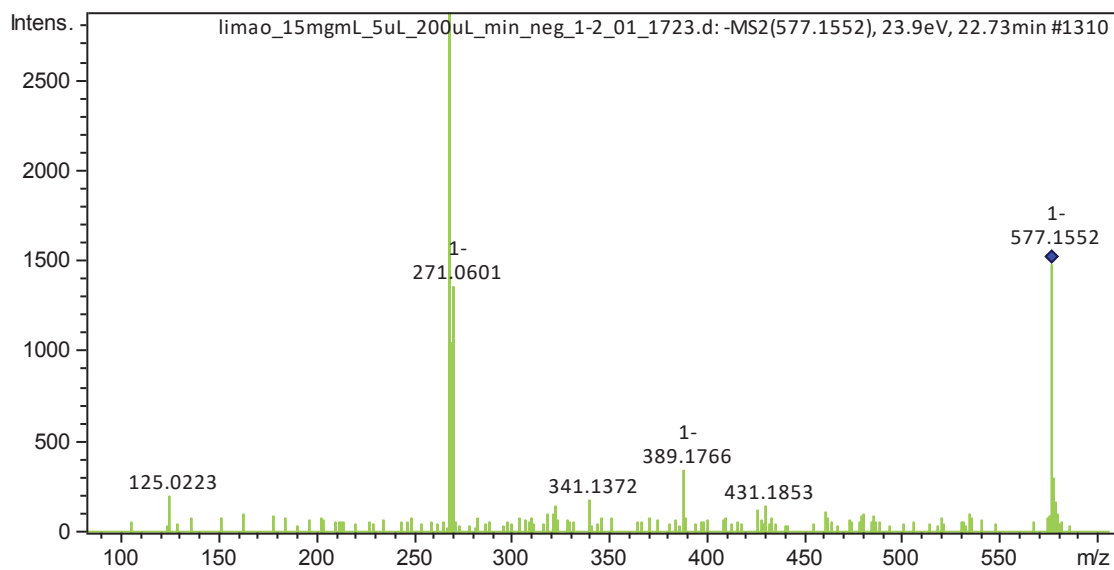


Figura 45. Espectro de ESI⁻ (24eV) para flavona O-7-diglucosídeo m/z 577,1552.

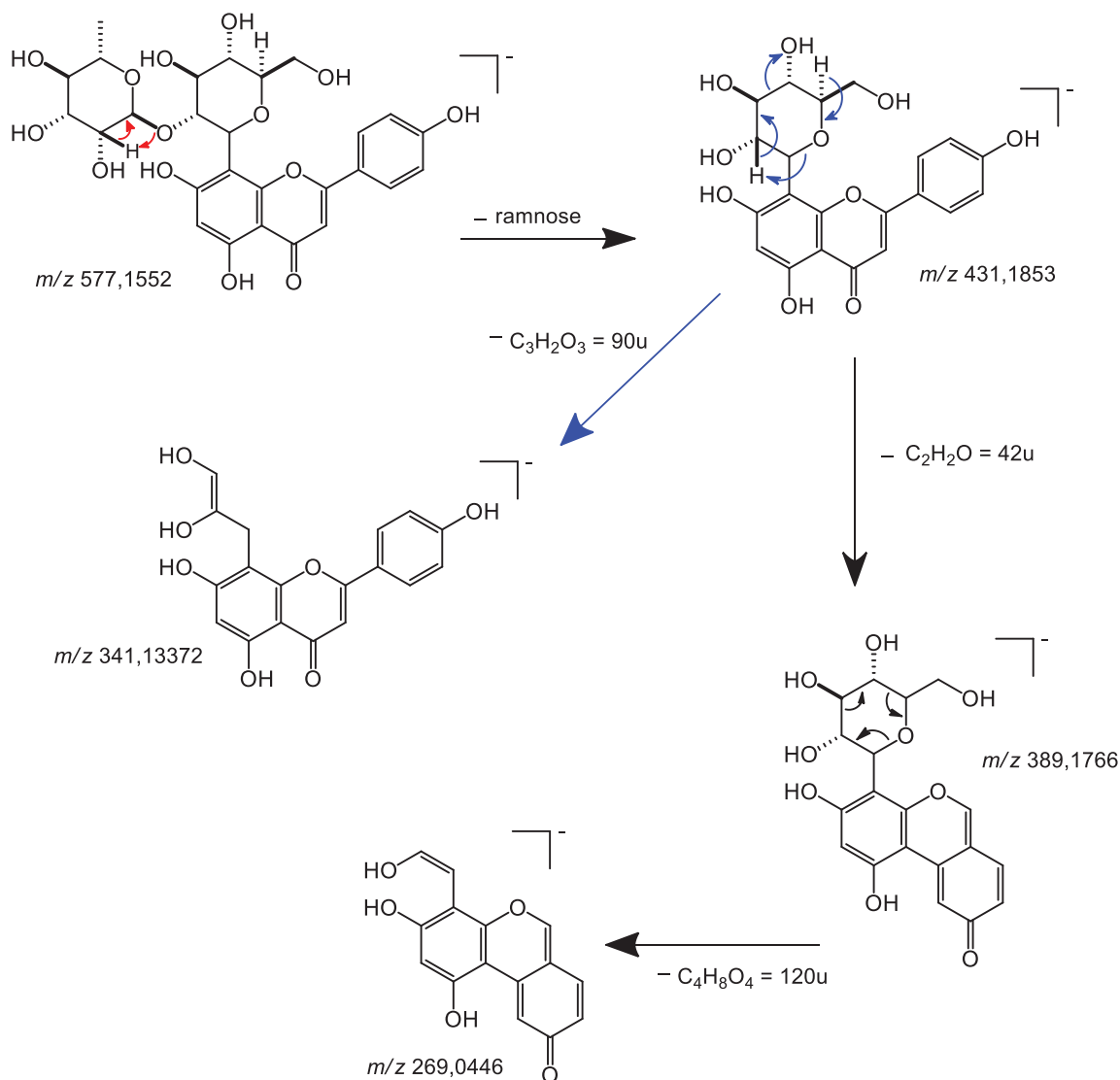


Figura 46. Proposta de fragmentação para C-flavona m/z 577,1552, modo ESI⁻.

Ambas, vitexin 2"-O-rhamnoside e apigenin-7-O-rutinoside, foram relatadas em suco de *Citrus*.

Apigenin-7-O-rutinoside (isorhoifolin) foi encontrada em suco de *C. paradisi*, *C. limon*, *C. sinensis*, *C. reticulata* e *C. unshiu*, enquanto que o isômero neohesperidose (rhoifolin) foi relatado para suco de *C. bergamia*, *C. sinensis* e *C. paradisi*. Uma vez que esse último foi encontrado apenas em laranjas, enquanto que o isômero rutinosídeo está presente na composição de suco de limões, sugere-se que um dos compostos aqui apresentados seja a apigena-7-O-rutinosídeo.

O composto que apresentou fragmentações típicas de flavona-C-glicosilada, juntamente com a perda de ramnose, foi sugerido como vitexin 2"-O-rhamnoside, sendo este apenas relatado para fruto de *C. microcarpa*.

4.5.3 Substância m/z 594,1585 ($C_{27}H_{30}O_{15}$)

O íon fragmento 593,1525 (ESI^-) foi observado para dois tempos de retenção diferentes, em $t_r = 15,7$ min e $t_r = 20,5$ min. Avaliando as possíveis estruturas já relatadas em suco ou fruto de citros muitos flavonoides C/O-diglicosilados foram encontrados, e duas possíveis fórmulas moleculares foram consideradas: $C_{28}H_{34}O_{14}$ (m/z 594,1943) (flavanona + metila) e $C_{27}H_{30}O_{15}$ (m/z 594,1585) (flavonas). Ao comparar a massa exata (594,1585) calculada para essas fórmulas moleculares com massa experimental, os compostos referentes à $C_{28}H_{34}O_{14}$ foram descartados, devido a diferença de massa muito grande. Enquanto que para $C_{27}H_{30}O_{15}$ a diferença foi de 4,0 mDa. Sendo assim, as possíveis estruturas estão representadas na Figura 46.

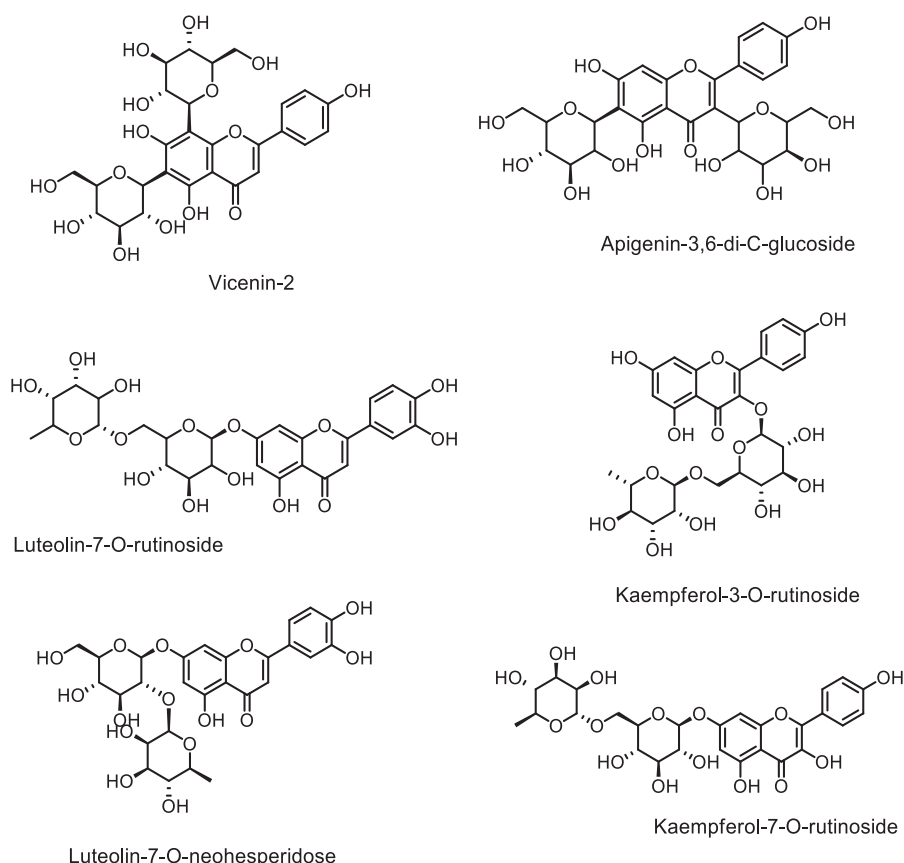


Figura 47. Estruturas de flavonas propostas para m/z 594,1585 Da ($C_{27}H_{30}O_{15}$), encontrados em suco de *Citrus*.

Para $t_r = 20,5$ min foram encontrados fragmentos referentes a clivagem de flavona e não foram observados fragmentos típicos de flavonol, descartando assim a possibilidade de serem isômeros do kaempferol. Logo, esses fragmentos foram atribuídos a luteolina-7-O-diglicosídeo.

Os espectros no modo ESI^- apresentaram como pico base os íons m/z 285,0395 (Figura 47) e com praticamente a mesma intensidade, o íon m/z 287,0551, sendo este último atribuído à aglicona da flavanona eriocitrina, já elucidada por comparação com padrão, a qual coeluiu na mesma banda cromatográfica.

O fragmento m/z 285,0395 foi atribuído ao íon aglicona de flavona, devido à perda neutra de 308u, o que confirmaria a proposta para a luteolina-7-O-rutinosídeo ou hesperidose. Outro fragmento intenso encontrado para energias inferiores a 43 eV, foi íon m/z 459,1113, o qual foi atribuído, em nossas análises anteriores, ao íon correspondente à clivagem por RDA, sem a perda da unidade diglicosídica. Esse fragmento foi atribuído à unidade de rutinosídeo das flavanonas narirutina e eriocitrina, ligado em C7 do anel A.

No espectro no modo ESI⁺ (27 eV) foi observado o fragmento m/z 449,1073, indicando a perda neutra de 146u, unidade de ramnose. Ainda foi observado o íon referente à perda da aglicona por RDA: m/z 151,0037 (ESI⁻) e m/z 153,0491 (ESI⁺) (ANEXO 14).

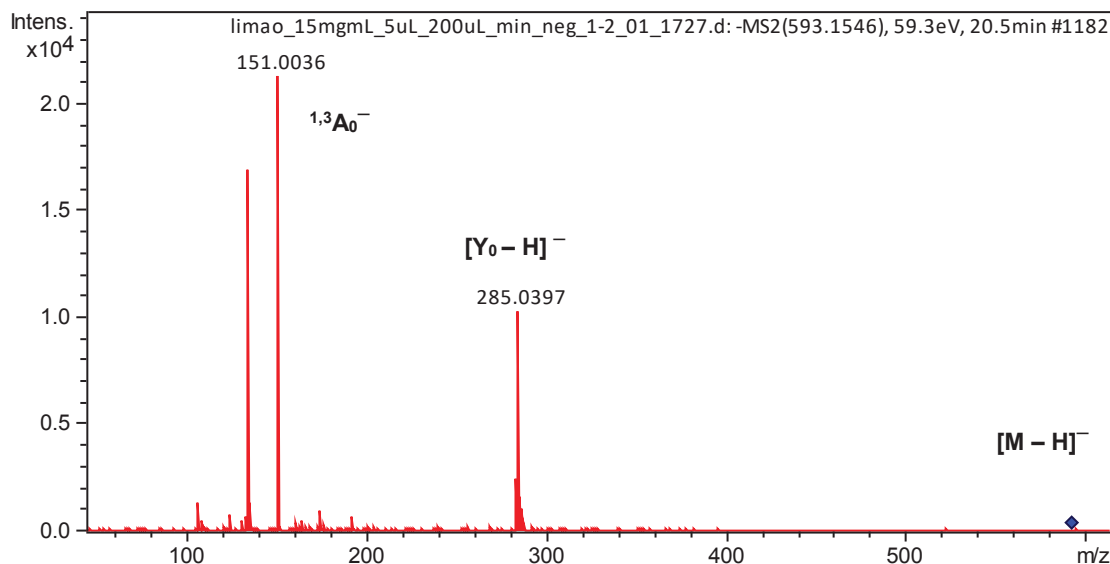


Figura 48. Espectro de ESI⁻ (59eV) para luteolina 7-O-rutinese m/z 593,1494.

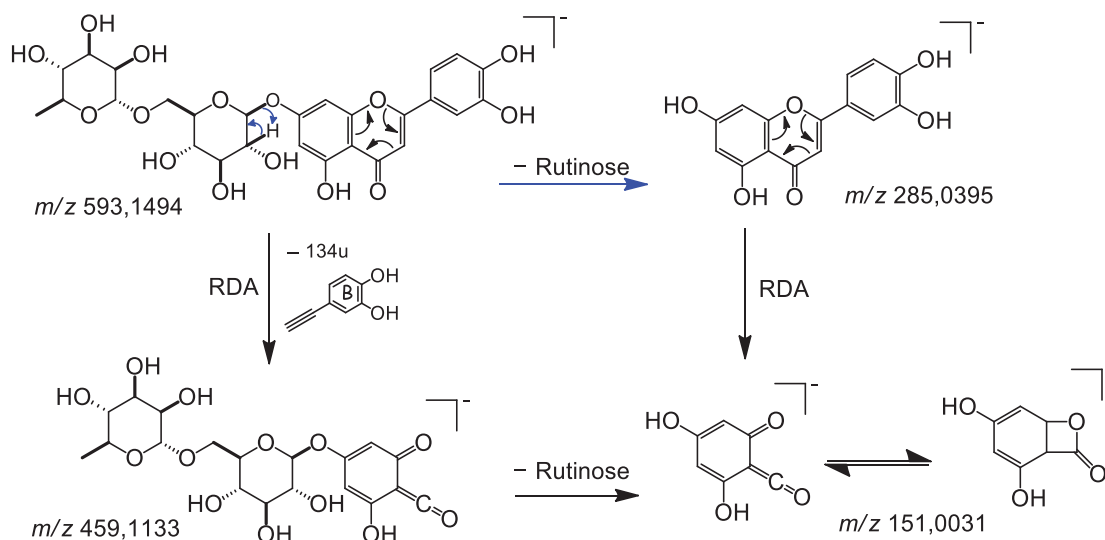


Figura 49. Proposta de fragmentação para luteolina 7-O-rutinese m/z 593,1494, modo ESI⁻.

Para flavonóis 3-O-glicosilados, foi observado que a razão da clivagem homolítica/heterolítica aumenta de acordo com o maior número de grupos OH no anel B. Diferentemente, para flavonas 7-O-glicosiladas, o aumento de grupos OH no anel B faz com que essa razão diminua (FERRERES. LLORACH. GIL-IZQUIERDO, 2004).

Para os espectros aqui obtidos não foi observado o íon referente a clivagem homolítica.

Para a banda em $t_r = 15,7$ min as fragmentações referentes ao íon m/z 593,1494 (ESI^-) foram típicas de flavonoide-C-diglicosilado, sendo observados íons fragmentos referentes as perdas de 90u e 120u. Os principais íons encontrados para o espectro no modo ESI^- (43 eV) foram m/z 503,1180, referente a perda neutra de 90u, com posterior perda de 120u, obtendo o íon m/z 383,0759. O íon m/z 473,1072, referente a perda neutra de 120u, a partir do m/z 593. E ainda, referente ao pico base, m/z 353,0656, outra perda neutra de 120u, a partir do m/z 473, com posterior perda de duas unidades de CO, sequenciais, levando aos íons m/z 325 e 297. Perdas neutras de CO juntamente com os fragmentos referentes a RDA geram os íons m/z 191 e 117, observados para os experimentos com 59 eV (ANEXO 13). O fragmento m/z 117 comprova a ausência de C-glucose em C-3 no anel C, o que leva a aferir que essa substância se trata de vicenin-2 (Figuras 49 e 50).

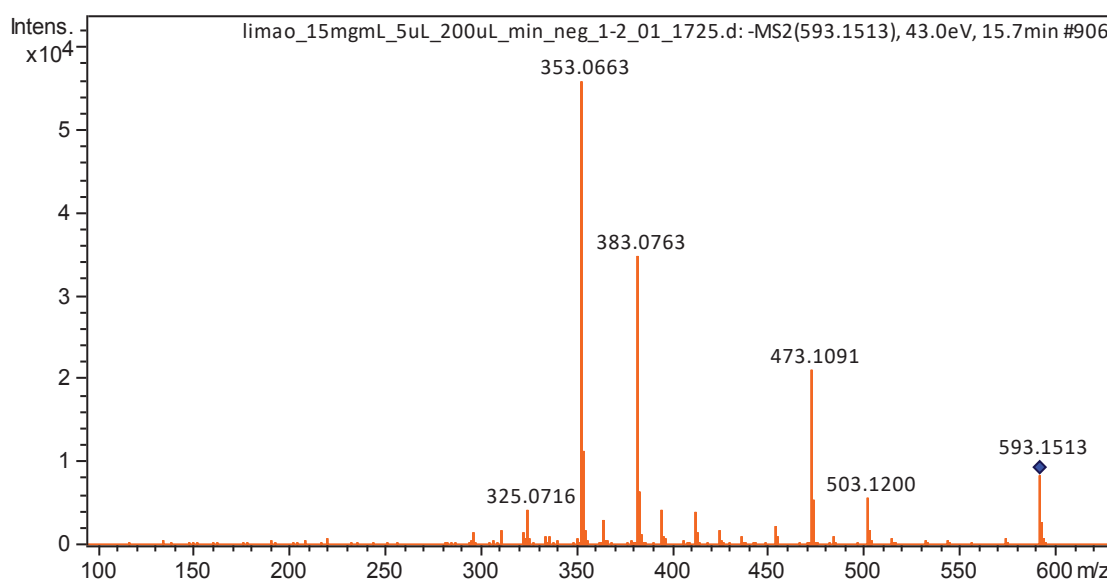


Figura 50. Espectro de ESI^- (43eV) para vicenina-2 m/z 593,1494.

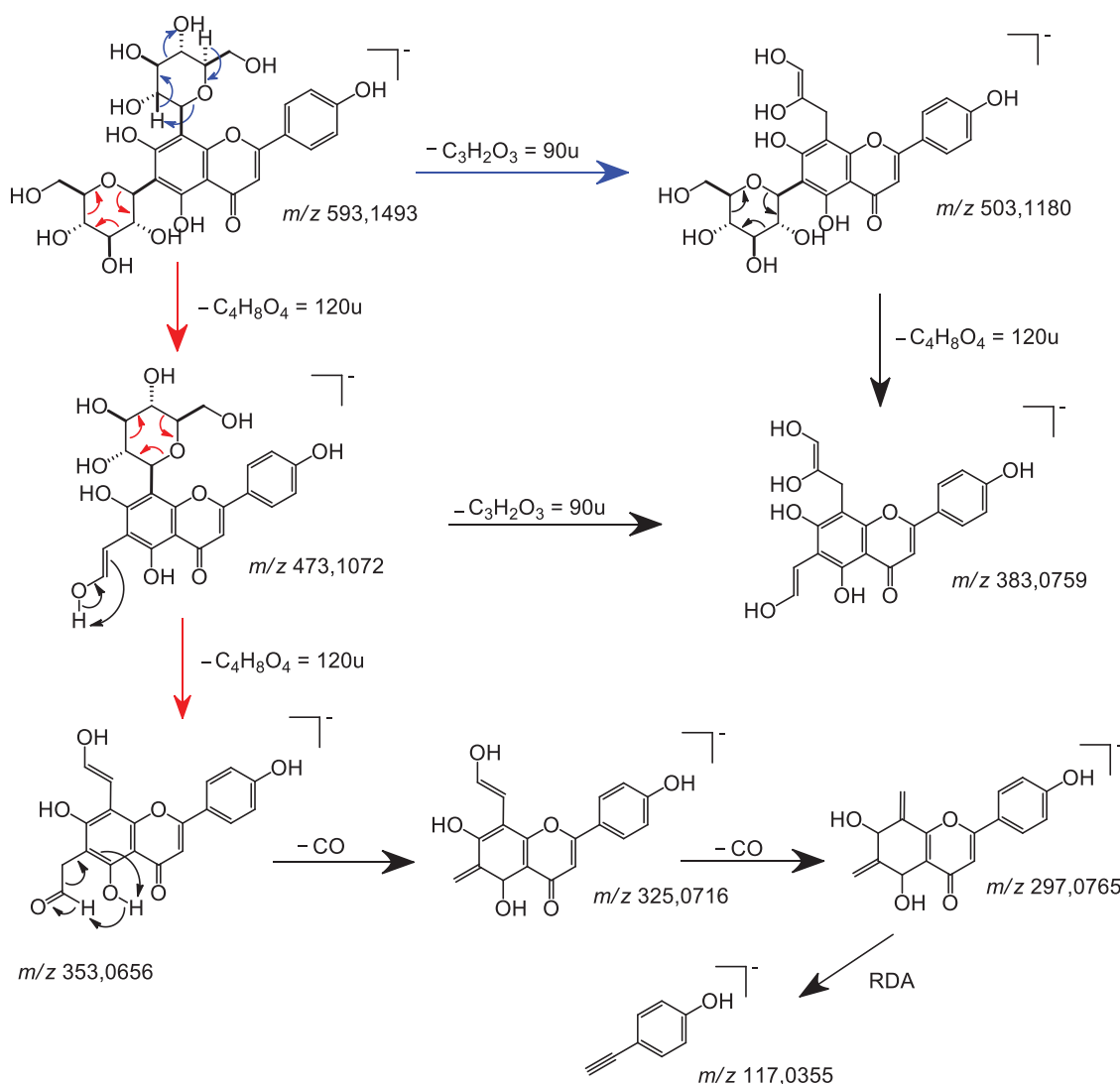


Figura 51. Proposta de fragmentação para vicenina-2 m/z 593,1494, modo ESI⁻.

Vicenina-2 já foi identificada em suco de *C. limon*, *C. grandis*, *C. paradisi*, *C. sinensis*, *C. reticulata*, *C. clementina*, *C. deliciosa* e *C. bergamia*. Enquanto que luteolina 7-O-rutinosídeo foi relatada em suco de *C. sinensis*, *C. unshiu*, *C. reticulata* e *C. limon*.

Ambas as flavonas foram identificadas em trabalho realizado por Brito *et al.*, 2014, no qual avaliaram as casca e polpa de *C. aurantifolia* e *C. lemon*. As flavonas foram identificadas por comparação com padrões, e tiveram como principais fragmentos m/z 473, 353 e 297 para vicenin-2 (apigenin 6,8-di-C-glucoside) e m/z 285 para luteolina 7-O-rutinosídeo.

4.6 ENSAIO *IN VITRO* DE INIBIÇÃO DE COX-1 E COX-2

Para avaliar a inibição da atividade enzimática das ciclo-oxigenases, foi utilizado o kit de triagem de COXs. Esse tipo de ensaio permitiu avaliar a atividade de inibição específica para COX-1 e COX-2, do suco de limão fresco e de alguns padrões de flavonoides identificados no suco (hesperidina, eriocitrina e rutina). A fim de detectar se havia seletividade específica para COX-2, uma vez que essa isoforma está envolvida na síntese de mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas E_2 e $F_{2\alpha}$, as quais são o foco de interesse nesse trabalho.

COX-2, conforme discutido na introdução, tem sua expressão induzida por estímulos, como tecido danificado, citocinas inflamatórias, entre outros. E tem sido muito estudada como alvo da atividade dos anti-inflamatórios não-esteroidais.

Nesse tipo de ensaio enzimático é medida a quantidade de $PGF_{2\alpha}$ produzida na reação. Nessa reação o ácido araquidônico é catalisado pela COX-1/2 para a formação do intermediário PGH_2 , o qual é reduzido por $SnCl_2$ para a formação da prostaglandina. A quantificação foi feita por ELISA usando antisoro (anticorpos policlonais) específico, o qual se liga às PGs produzidas pela reação *in vitro* de COX com o substrato ácido araquidônico.

As amostras foram preparadas conforme descrito na Tabela 13.

Tabela 13. Preparo de soluções para ensaio enzimático.

BC	160	10	10 ^(fervida)	10 ^(TPC)	10	30
COX-1*	160	10	10	10 ^(TPC)	10	30
Amostras	160	10	10	10	10	30

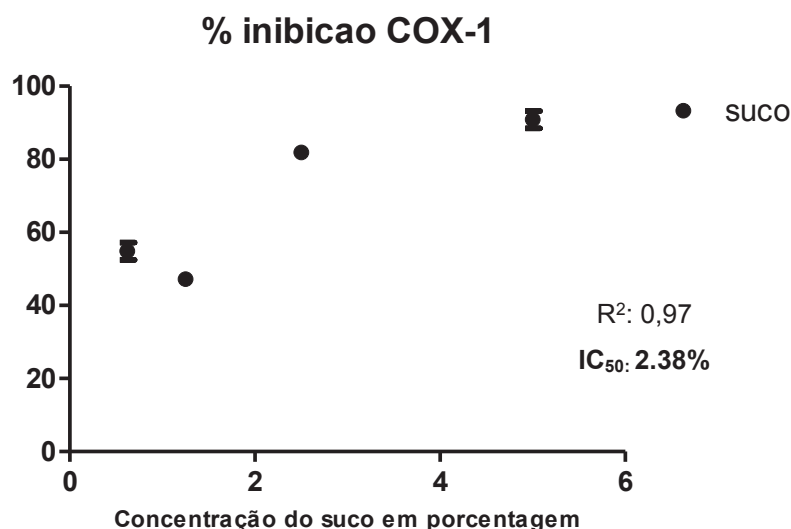
BC: COX inativada, por aquecimento. TPC: tampão (Tris-HCl 0,1 M. pH 8. 5). AA: ácido araquidônico. $SnCl_2$: solução de cloreto de estanho.

A amostra BC é utilizada como controle ou “zero”, é realizada com a enzima inativada. O valor obtido nesse teste é descontado das amostras, a fim de normalizar os resultados. Enquanto que o ensaio COX-1* é realizado com a enzima ativa e sem inibidor, para verificar a produção de prostaglandina (100%) e garantir que a enzima está em atividade.

O suco foi testado em quatro diferentes diluições: 5%. 2,5%. 1,25% e 0,62%. E os padrões foram testados em quatro concentrações: 64. 16. 8,0 e 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Como controle positivo foi utilizado a indometacina, anti-inflamatório não esteroidal, o qual é um potente inibidor não-seletivo de COX. Indometacina apresenta um mecanismo de inibição tempo-dependente, o qual requer de segundos a minutos para se ligar ao sítio ativo COX, e uma vez ligado, esse tipo de medicamento pode levar horas para se deligar do sítio ativo. Liga-se primeiramente ao sítio ativo COX em uma interação “solta” e seguido de uma interação “apertada”. Essa última é o passo limitante da velocidade de formação do complexo: AINE-COX (SIMMONS, 2004).

Os resultados avaliando a concentração inibitória de 50% (IC_{50}) foram determinados pela curva de dose-resposta sigmoideal, representada nos gráficos a seguir.



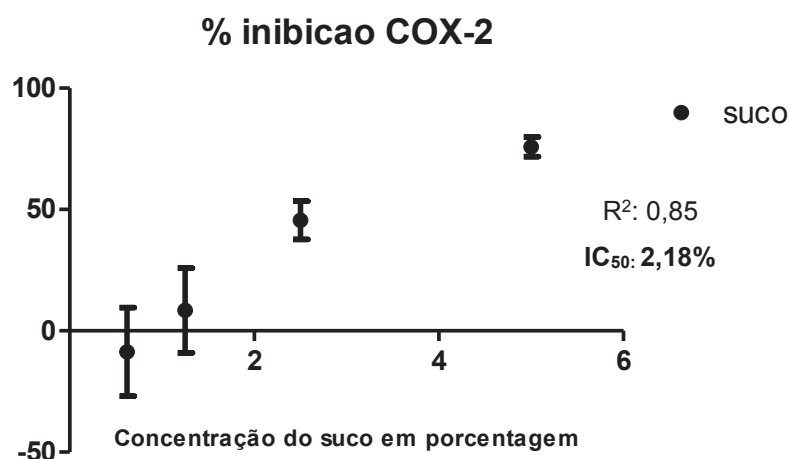


Figura 52. Gráficos de porcentagem de inibição do suco de limão Tahiti para COX-1 (acima) e COX-2 (abaixo).

Diante dos resultados obtidos (Tabela 14) foi possível observar que o suco inibiu tanto COX-1 (2,38%), quanto COX-2 (2,18%), numa porcentagem muito semelhante. Embora um pouco mais seletivo para COX-2, não apresentou especificidade relevante diante das isoformas da ciclo-oxigenase. O suco por ser uma matriz complexa, foi testado em porcentagem de diluição, devido ao fato de não se tratar de uma única substância, não é possível calcular sua concentração em μM ou $\mu\text{g mol}^{-1}$. Nestes casos é aceitável o cálculo de inibição por porcentagem, o mesmo é observado em estudo realizado por JACOB. PRAKASH (2015), o qual avaliou a inibição de extratos de plantas frente às mesmas enzimas.

Tabela 14. Valores de IC_{50} para inibição de COX-1 e 2.

Amostras testadas	COX-1 (IC_{50})	COX-2 (IC_{50})
Suco fresco	2,38%	2,18%
Indometacina	0,002 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,180 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Hesperidina	30,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	---
Rutina	---	---
Eriocitrina	---	---

Ao comparar a inibição do suco com o padrão indometacina, considera-se que o suco apresentou forte inibição, uma vez que, ao estimar a concentração relativa dos flavonoides no suco, esses se encontram na escala de $\mu\text{g mL}^{-1}$, o mesmo que a indometacina. Se considerarmos que em 400 mL da mistura de suco de Citrus

sinensis e *Citrus limon* (Medina *et al.*, 2013) contém 115 mg de fenólicos totais, ao calcular 10 µL de suco de limão Tahiti, teríamos cerca de 3 µg de compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides. Entretanto, as concentrações aqui testadas foram menores ainda, o que leva a deduzir que a atividade de inibição do suco encontra-se no nível da indometacina.

Dos flavonoides testados isoladamente apenas hesperidina mostrou fraca inibição para COX-1 de 30,5 µg mL⁻¹. Enquanto que eriocitrina e rutina não apresentaram atividade significativa. Diante desses resultados, pode-se sugerir que a atividade do suco seja derivada de um efeito de sinergismo de mais de um composto presente, ou ainda, de outros compostos não testados.

4.7 FLAVONOIDES DO SUCO DE LIMÃO TAHITI E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Avaliando atividade anti-inflamatória dos flavonoides identificados para o suco de limão Tahiti, muitos relatos têm sido encontrados na literatura.

Eriocitrina foi encontrada em altos níveis em casca e vesículas de suco de várias espécies de citros. Em estudo *in vivo*, eriocitrina mostrou atividade inibitória para as enzimas 5-lipoxigenase (5-LOX) (IC₅₀ 29,1 µmol L⁻¹) e 12-lipoxigenase (12-LOX) (IC₅₀ 22,3 µmol L⁻¹), presentes em leucócitos de ratos. A aglicona (eriodictiol), apresentou-se muito mais potente para ambas as enzimas IC₅₀ 0,20 µmol L⁻¹ e IC₅₀ 0,07 µmol L⁻¹ para 5-LOX e 12-LOX, respectivamente. Inibiu, ainda, leucotrieno B₄ (IC₅₀ 12,7 µmol L⁻¹). Ambas as enzimas estão diretamente relacionadas com processos inflamatórios da cascata do ácido araquidônico (NOGATA *et al.*, 2007).

Em estudo *in vivo*, a aplicação tópica de rutina na pele do camundongo inibiu significativamente a expressão de (COX-2) induzida por UVB e indução de óxido nítrico sintase (iNOS), sendo essas duas enzimas envolvidas nos processos inflamatórios (CHOI *et al.*, 2013).

Ainda, em outro estudo *in vivo*, administração oral de rutina em ratos, foi capaz de diminuir os níveis de marcadores inflamatórios, dentre eles COX-2. Esses experimentos foram conduzidos por imuno-histoquímica (NAFEES *et al.*, 2015).

Outro estudo com rutina, sendo testada especificamente para COX-2 utilizando kit enzimático, assim como em nosso trabalho, mostrou que rutina foi capaz de inibir apenas 10% da atividade da enzima, sendo esse resultado quase insignificante.

Entretanto, oligômeros de unidades de rutina mostraram atividade pronunciada, cerca de 70% de inibição (UZAN et al., 2011).

A atividade de inibição de hesperidina frente à COX-2, relatado na literatura, todos os estudos realizados tratam-se de estudos de administração oral (*in vivo*) de hesperidina ou sua forma aglicona, hesperitina, por imuno-histoquímica, western blot ou expressão gênica por PCR (NALINI. ARANGANATHAN. KABALIMURTHY, 2012. KAMARAJ et al., 2010).

Estudo em células (macrófagos) avaliando tratamento com hesperidina mostrou supressão da produção de PGE₂, pela inibição de COX-2, utilizando ensaio semelhante ao nosso trabalho (imunoensaio). Entretanto, ao avaliar expressão de COX-2, os resultados mostraram que hesperidina não causou nenhuma variação no nível da enzima, apesar de diminuir a produção de prostaglandina. O que sugere que o mecanismo de ação do flavonoide não depende apenas da via metabólica de COX, mas sim de outras relacionadas ao processo inflamatório.

Embora em nosso trabalho não tenhamos medido os níveis de COXs, encontramos que o suco de limão Tahiti foi capaz de inibir a produção de PGF_{2α}, ou seja, o suco possui substâncias capazes de inibir a produção de PGs por ambas as COXs. O que pode ser atribuído, ainda, ao efeito de sinergismo.

Entretanto quando ensaiados separadamente, os compostos hesperidina, rutina e eriocitrina, não apresentaram atividade significativa. Esses resultados não significam que essas substâncias não possuam atividade anti-inflamatória, mas elas podem atuar em outros sítios que não o da COX-2. Ou ainda, em processos fisiológicos paralelos que interfiram na atividade dessa enzima, bem como na produção de prostaglandinas.

Além disso, conforme temos observado na literatura, comparando resultados de ensaios *in vivo* com ensaios *in vitro*, tem mostrado que os efeitos obtidos podem ser diferentes. Uma vez que no organismo temos inúmeros processos biológicos acontecendo e interferindo um no outro, o que resulta em um efeito sistêmico e não isolado.

5 CONCLUSÃO

A análise química do perfil do suco de limão Tahiti, até o presente momento, forneceu a identificação de flavonoides glicosilados por comparação com padrões e, ainda, aferição de outros flavonoides por desreplicação. Foram identificadas 3 flavanonas (eriocitrina, hesperidina e naringina), 1 flavonol (rutina) e 5 flavonas (diosmina, luteolina 7-O-rutinese, vitexin 2"-O-rhamnoside e vicianina-2).

Os flavonoides hesperidina, rutina, naringina, eriocitrina e diosmina já haviam sido relatados anteriormente por Nogata *et al.*, 2006, único estudo encontrado para suco de limão Tahiti. Enquanto que vitexin 2"-O-rhamnoside, apigenin-7-O-rutinoside, luteolina 7-O-rutinese e vicianina-2 são relatadas pela primeira vez.

O suco de limão mostrou forte inibição da produção de prostaglandina, via imunoensaio da atividade inibitória de COX-1 e COX-2, enquanto que os flavonoides hesperidina, eriocitrina e rutina, testados isoladamente, não apresentaram inibição significativa. O que sugere que a atividade anti-inflamatória desses compostos, muito bem conhecida na literatura para análises *in vivo*, se devem à inibição de outras rotas da cascata da inflamação. Enquanto que a atividade inibitória do suco indica que outros compostos ou mesmo o efeito sinérgico tem ação frente à enzima.

6 CONCLUSÃO GERAL

Durante o processo menstrual, eventos do tipo inflamatórios levam à ruptura do tecido endometrial e ao sangramento, caracterizando o endométrio humano como processo inflamatório. Esses eventos de natureza inflamatória levam a produção de mediadores químicos da inflamação, como aumento da síntese de prostaglandinas, citocinas, metaloproteinases de matriz e quimiocinas pró-inflamatórias. Seguido do aumento de leucócitos para o local de inflamação que, juntamente com o fator de diminuição de oxigênio nas células, causado pela ação das prostaglandinas, levando à ruptura do tecido e sangramento característico da menstruação (CUNNINGHAM et al., 2012. KING. CRITCHLEY, 2010).

Durante a fase secretora do ciclo menstrual, a progesterona inibe a síntese de prostaglandinas, contudo com a queda dessa ao final do ciclo, a expressão da COX-2 é rapidamente elevada. A COX-2 atua sobre o ácido araquidônico para formar o intermediário prostaglandina PGH_2 , que é subsequentemente metabolizado por sintases específicas para formar prostaglandinas.

O aumento dos níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ao final da fase lútea é devido a seu efeito vasoconstritor dos vasos capilares e a diminuição da circulação sanguínea no endométrio. Enquanto que os altos níveis da PGE_2 na menstruação estejam relacionados com o relaxamento do colo uterino nessa fase, devido ao efeito relaxador da PGE_2 (EVANS. SALAMONSEN, 2012).

Vários estudos têm associado os distúrbios do ciclo menstrual, principalmente o fluxo menstrual excessivo e a dismenorreia, com anormalidades na produção de prostaglandinas, em especial das E_2 e $\text{F}_{2\alpha}$ (DEB. RAINE-FENNING, 2008. BERBIC. FRASER, 2013).

Níveis elevados de PGs têm sido associados com sangramento menstrual excessivo ou anormal (80 mL). Experimentos tem mostrado que em mulheres com sangramento excessivo o nível de PGE_2 é muito maior do que níveis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (SMITH. JABBOUR. CRITCHLEY, 2007. DEB. RAINE-FENNING, 2008).

O tratamento destas disfunções tem sido realizado basicamente pelo uso anti-inflamatórios não esteroidais, mas nem sempre esse tipo de abordagem é eficaz e seguro.

Em outro trabalho realizado em colaboração com nosso grupo de pesquisa (ROBELDO. 2017), o qual também investigou os efeitos do suco de limão Tahiti no

controle do fluxo menstrual, avaliando um número maior de voluntárias (n=15) em cada grupo, realizou a quantificação de PGE₂ e PGF_{2α} por kit ELISA. Esses resultados, levando em conta um número maior de amostras para cada grupo foi possível observar mais claramente essa tendência nos níveis de PGs aqui encontrados. Os quais também indicam um aumento de PGF_{2α} no grupo tratado com limão Tahiti e diminuição de PGE₂. Esses resultados mostram que ambos os trabalhos se complementam, confirmando então que a diminuição do fluxo menstrual pelo efeito do suco de limão Tahiti é baseada na alteração dos níveis de PGs.

Em estudo realizado por SMITH *et al.*, (2007), foi observado um aumento significativo na expressão de genes de COX-1 e COX-2 no endométrio de mulheres com sangramento excessivo, quando comparado com endométrio de mulheres com sangramento normal. Além disso, não foram detectadas diferenças significativas na expressão de prostaciclina e tromboxanos. Contudo, foi observado uma diminuição na expressão dos receptores de PGF_{2α} no endométrio de pacientes com sangramento menstrual excessivo. Enquanto que para receptor específico de PGE₂ foi observado um aumento.

Diante disso, é possível sugerir, com os resultados aqui obtidos e associados com as informações da literatura, que o aumento da produção de PGF_{2α} pela ação do suco de limão Tahiti pode ser a explicação para a redução do sangramento, uma vez que com sua atividade vasoconstritora, leva a diminuição dos calibres dos vasos sanguíneos, o que levaria ao bloqueamento da passagem de sangue nessas artérias, reduzindo assim o sangramento.

Além disso, o suco de limão Tahiti ao elevar os níveis de PGF_{2α} e diminuir o sangramento indica ser uma fonte de tratamento alternativo e eficaz, sem efeitos colaterais conhecidos até o presente momento. Além de ser um produto natural bastante acessível e de baixo custo.

Adicionalmente, pela avaliação da composição química do suco foi possível identificar flavonoides, em sua grande maioria O-glicosilados e, em menor quantidade, C-glicosilados. Sabe-se que esses apresentam forte atividade anti-inflamatória, atuando em diferentes rotas da cascata da inflamação.

Embora o suco de limão tenha inibido a produção de prostaglandina no ensaio *in vitro*, avaliando a inibição de COX-1 e 2, em nosso estudo *in vivo*, a concentração de PGs no fluido menstrual não teve o mesmo comportamento. O que sugere que a inibição da expressão de COX-2 não é o mecanismo principal responsável pela ação

do suco do limão Tahiti no controle das disfunções menstruais, mas, sim, por outros mecanismos que induzam a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Tem sido proposto na literatura que $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode ser sintetizada por três vias específicas e diferentes, partindo do intermediário PGH_2 formado pela ação de COX-2, pela ação das enzimas PGF sintase. Essas pertencem à família de enzimas do grupo aldo-ceto redutase (AKRs), NADPH-dependente, as quais estão presentes em quase todos os organismos. Em humanos as AKRs catalisam a redução de PGH_2 e PGD_2 em $\text{PGF}_{2\alpha}$ e seu isômero $9\alpha,11\beta\text{-PGF}_{2\alpha}$, mas não usa PGE_2 como substrato (KABUTUTU et al., 2009).

- I. O grupo 9-ceto de PGE_2 é reduzido para $\text{PGF}_{2\alpha}$ (AKR1C5).
- II. O grupo 9,11-endoperóxido de PGH_2 é reduzido para $\text{PGF}_{2\alpha}$ (AKR1B1/C3).
- III. O grupo 11-ceto de PGD_2 é reduzido para $9\alpha,11\beta\text{-PGF}_{2\alpha}$ (isômero de $\text{PGF}_{2\alpha}$) (AKR1C3).

Ambas as enzimas, AKR1B1 e AKR1C3, estão presentes no endométrio durante o ciclo menstrual, sendo AKR1B1 localizada no epitélio glandular e nas células do estroma e AKR1C3 nas células epiteliais (SINREIH et al., 2015).

Diante disso, a ação do suco de limão Tahiti poderia ser na rota específica das AKRs, principalmente pela rota II, direcionando o intermediário PGH_2 diretamente para a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, ao invés de causar inibição de COX-2. Entretanto, estudos devem ser realizados para comprovar essa hipótese.

Em estudo realizado avaliando o efeito de flavonoides agliconas na modulação de COX-2 produzida em células intestinais, os resultados mostraram que em níveis basais de COX-2, flavonas e flavonóis aumentaram a expressão dessa enzima. O efeito das flavonas foi relativamente menor em comparação com o efeito dos flavonóis. Sendo que kaempferol, quercetina e luteolina quase duplicaram a expressão da enzima, com efeitos menores para apigenina e crisina, enquanto que diosmetina não apresentou efeito (LÓPEZ-POSADAS et al., 2010).

Pode-se concluir que esse efeito dos flavonoides na modulação positiva de COX-2 é devido às unidades de agliconas. Uma vez que flavonoides glicosídicos sofrem clivagem da unidade de açúcar por enzimas β -glicosidases de bactérias presentes no intestino, principalmente O-desglicosilação (BRAUNE. BLAUT, 2016).

Nossos resultados mostraram que o suco de limão Tahiti é rico em flavonoides O-glicosilados, principalmente pela composição de unidades agliconas de quercetina (proveniente da rutina), luteolina e apigenina, justificando nossos resultados

encontrados para o aumento da produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, via COX-2, em estudo *in vivo*. Uma vez que em nossos ensaios *in vitro* testamos apenas flavonoides glicosilados, rutina, eriocitrina e hesperidina, os quais não apresentaram atividade frente à COXs.

Além disso, na literatura é relatado que o tempo de meia-vida plasmática de flavonoides é de cerca de uma a duas horas após a ingestão e a excreção urinária é dose-dependente, proporcional a ingestão de flavanonas (ERLUND et al., 2001. ERLUND et al., 2002).

O que estaria de acordo com a redução do sangramento menstrual modulado pela ação dos flavonoides do suco de limão, pois esse efeito é rapidamente observado pelas voluntárias após a ingestão.

Esse estudo é considerado um primeiro passo para a avaliação do potencial biológico do suco de limão Tahiti no controle de distúrbios menstruais, como sangramento excessivo.

Como considerações futuras será continuado os estudos da composição química do suco de limão, a fim de verificar o maior número de compostos possíveis que possibilite associar à atividade biológica. Além disso, a quantificação de prostaglandinas em um grupo maior de voluntárias seria interessante para ratificar a tendência de variação nos níveis de PGs observados. E, ainda, seria interessante avaliar a atividade das agliconas derivadas dos glicosídeos perante as enzimas COXs e AKRs.

Realizamos, ainda, experimentos de análise de proteômica do fluido menstrual de ambos os grupos: limão e controle, por LC-MS/MS, no *Institute for Systems Biology*, em Seattle-USA, em colaboração com o Dr. Robert Moritz. Entretanto esses resultados estão ainda em fase de análise devido à sua complexidade. A análise da composição de proteínas poderá fornecer informações úteis com relação à ação do suco frente a outras possíveis rotas inflamatórias.

REFERÊNCIAS

- ABAD-GARCÍA, B. et al. On line characterization of 58 phenolic compounds in Citrus fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. **Talanta**, v. 99, p. 213–224, 2012.
- ALAM, M. A. et al. Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 5, n. 4, p. 404–417, 2014.
- ANDEL, T. VAN et al. Medicinal plants used for menstrual disorders in Latin America, the Caribbean, sub-Saharan Africa, South and Southeast Asia and their uterine properties: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 992–1000, 2014.
- ANDRADE, P. et al. CITRUS THERAPY CONTROLLING THE MENSTRUAL FLOW. **International Journal of Phytotherapy**, v. 5, n. 2, p. 98–101, 2015.
- ARAUJO, P. et al. Development and validation of an extraction method for the determination of pro-inflammatory eicosanoids in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 57–64, 2014.
- AZIATO, L.. DEDEY, F.. CLEGG-LAMPTEY, J. N. A. The experience of dysmenorrhoea among Ghanaian senior high and university students: Pain characteristics and effects. **Reproductive Health**, v. 11, n. 1, 2014.
- BAIRD, D. T. et al. Prostaglandins and menstruation. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 70, n. 1, p. 15–17, 1996.
- BENAVENTE-GARCÍA, O.. CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6185–6205, 2008.
- BERBIC, M.. FRASER, I. S. Immunology of normal and abnormal menstruation. **Women's Health**, v. 9, n. 4, p. 387–395, 2013.
- BHATIA, H. et al. Traditional phyto remedies for the treatment of menstrual disorders in district Udhampur, J&K, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, p. 202–210, 2015.
- BOJA, E. S.. RODRIGUEZ, H. The path to clinical proteomics research: Integration of proteomics, genomics, clinical laboratory and regulatory science. **Korean Journal of Laboratory Medicine**, v. 31, n. 2, p. 61–71, 2011.
- BOONJOB, W. An Overview about Recent Advances of Micro-Solid Phase Extraction in Flow Based Techniques. **Austin J Anal Pharm Chem**, v. 1, n. 2, p. 1–6, 2014.
- BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). **Journal of Thermal Biology**, v. 31, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 208–219, 2006.
- BRAUNE, A.. BLAUT, M. Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. **Gut Microbes**, v. 7, n. 3, p. 216–234, 2016.
- BRITO, A. et al. HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. **Molecules**, v.

19, n. 11, p. 17400–17421, 2014.

BROSE, S. A.. BAKER, A. G.. GOLOVKO, M. Y. A fast one-step extraction and UPLC-MS/MS analysis for E2/D2series prostaglandins and isoprostanes. **Lipids**, v. 48, n. 4, p. 411–419, 2013.

CAO, H. et al. An improved LC-MS/MS method for the quantification of prostaglandins E2 and D2 production in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 372, n. 1, p. 41–51, 2008.

CARISTI, C. et al. Flavonoids detection by HPLC-DAD-MS-MS in lemon juices from Sicilian cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3528–3534, 2003.

CASS, Q. B. & DEGANI, A. L. G. (2009). Desenvolvimetro de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação. Series Apontamentos, EdUFSCar, 77p. ISBN: 978-85-85173-61-6.

CASSIANO, N. M.. BARREIRO, J. C.. CASS, Q. B. New trends in sample preparation in Brazil: An overview of bioanalytical applications by liquid chromatography. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25, n. 1, p. 9–19, 2014.

CATALANO, R. D. et al. Comprehensive expression analysis of prostanoid enzymes and receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. **Molecular Human Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 182–192, 2011.

CERQUEIRA, C. N. (2016). Busca de biomarcadores como indicadores do mecanismo de defesa da laranja Pera à infecção de CVC através de análise Metabonômica. São Carlos: UFSCar. 106f. Tese Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP.

CHANDRASEKHARAN, N. V.. SIMMONS, D. L. **The cyclooxygenases Genome Biology**, 2004.

CHEN, X. M.. TAIT, A. R.. KITTS, D. D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 218, p. 15–21, 2017.

CHOI, S. et al. Rutin inhibits B[a]PDE-induced cyclooxygenase-2 expression by targeting EGFR kinase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 10, p. 1468–1475, 2013.

COLDITZ, I. G. Effect of exogenous prostaglandin E2 and actinomycin D on plasma leakage induced by neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8. **Immunology and Cell Biology**, v. 68, n. 6, p. 397–403, 1990.

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por “Electrospray”: Processus químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

CUNNINGHAM, F.G.. LEVENO, K.J.. BLOOM, S.L.. HAUTH, J.C.. ROUSE, D.J.. SPONG, C.Y. (2012). Obstetrícia de Willians 23a edição, The McGraw-Hill companies, Portuguese-language translation copyright.

CUYCKENS, F.. CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2004.

DE OLIVEIRA, G. G. et al. Dereplication of Flavonoid Glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximilianii* by Untargeted Tandem Mass Spectrometry-

- Based Molecular Networking. **Planta Medica**, v. 83, n. 7, p. 636–646, 2017.
- DEB, S.. RAINE-FENNING, N. Dysmenorrhoea. **Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine**, v. 18, n. 11, p. 294–299, 2008.
- DEEMS, R. et al. Detection and Quantitation of Eicosanoids via High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. **Methods in Enzymology**, v. 432, n. 07, p. 59–82, 2007.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach**. [s.l: s.n.]. v. Second Edi
- DIXON, S. P.. PITFIELD, I. D.. PERRETT, D. Comprehensive multi-dimensional liquid chromatographic separation in biomedical and pharmaceutical analysis: A review. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 6–7, p. 508–529, 2006.
- DOMON, B.. COSTELLO, C. E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. **Glycoconjugate Journal**, v. 5, n. 4, p. 397–409, 1988.
- DONG, J. C. et al. Matrix metalloproteinases and their specific tissue inhibitors in menstruation. **Reproduction**, v. 123, n. 5, p. 621–631, 2002.
- EMA, E. M. A. Guideline on bioanalytical method validation. v. 44, n. July 2011, p. 1–23, 2011.
- ENS, W.. STANDING, K. G. Hybrid quadrupole/time-of-flight mass spectrometers for analysis of biomolecules. **Methods in Enzymology**, v. 402, p. 49–78, 2005.
- ERLUND, I. et al. Plasma Kinetics and Urinary Excretion of the Flavanones Naringenin and Hesperetin in Humans after Ingestion of Orange Juice and Grapefruit Juice. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 2, p. 235–241, 2001.
- ERLUND, I. et al. Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 9, p. 891–898, 2002.
- EVANS, J.. SALAMONSEN, L. A. Inflammation, leukocytes and menstruation. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 13, n. 4, p. 277–288, 2012.
- FABRE, N. et al. Determination of flavone, flavonol, and flavonone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass. **Elsevier Science**, v. 12, n. 01, p. 700–715, 2001.
- FENN, J. B. et al. Electrospray Ionization of Large for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 1989.
- FERREIRO-VERA, C. et al. Automated method for targeting analysis of prostanoids in human serum by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in selected reaction monitoring. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 20, p. 2848–2855, 2011.
- FERRERES, F.. LLORACH, R.. GIL-IZQUIERDO, A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 3, p. 312–321, 2004.

FILIPPOU, O.. BITAS, D.. SAMANIDOU, V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 44–62, 2017.

GATTUSO, G. et al. Flavonoid composition of citrus juices. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1641–1673, 2007.

GOBO, L. A. et al. A rapid method for identification and quantification of prostaglandins in cerebral tissues by UHPLC-ESI-MS/MS for the lipidomic in vivo studies. **Analytical Biochemistry**, v. 545, p. 98–103, 2018.

GUTTMAN, A.. VAROGLU, M.. KHANDURINA, J. Multidimensional separations in the pharmaceutical arena. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 3, p. 136–144, 2004.

GUYTON, A.C. e HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006.

HAMBERG, M. & SAMUELSSON, B. (1973). Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70:899–903.

HAMBERG, M., SVENSSON, J., e SAMUELSSON, B. (1974). Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action of prostaglandins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 71:3824–3828.

HILLEBRAND, S.. SCHWARZ, M.. WINTERHALTER, P. Characterization of anthocyanins and pyranoanthocyanins from blood orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7331–7338, 2004.

HO, S. C.. KUO, C. T. Hesperidin, nobiletin, and tangeretin are collectively responsible for the anti-neuroinflammatory capacity of tangerine peel (*Citri reticulatae* pericarpium). **Food and Chemical Toxicology**, v. 71, p. 176–182, 2014.

HOLČAPEK, M.. JIRÁSKO, R.. LÍSA, M. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 3–15, 2012.

HUBERT, J.. NUZILLARD, J. M.. RENAULT, J. H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 1, p. 55–95, 2017.

HVATTUM, E.. EKEBERG, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 1, p. 43–49, 2003.

HWANG, S. L.. SHIH, P. H.. YEN, G. C. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 877–885, 2012.

IMPELLIZZERI, D. et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of flavonoid-rich fraction of bergamot juice (BJe) in a mouse model of intestinal ischemia/reperfusion injury. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. JUL, 2016.

ISMAIEL, O. A. et al. Monitoring phospholipids for assessment of matrix effects in a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for hydrocodone and pseudoephedrine in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 859, n. 1, p. 84–93, 2007.

JACOB, J.. PRAKASH, K. B. . Dual COX / LOX Inhibition : Screening and Evaluation

of Effect of Medicinal Plants of Kerala As Anti- Inflammatory Agents. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 6, p. 62–66, 2015.

JÄGER, A. K.. SAABY, L. **Flavonoids and the CNS** *Molecules*, 2011.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

JOHNSON, N. Management of dysmenorrhoea. **Reviews in Gynaecological and Perinatal Practice**, v. 6, n. 1–2, p. 57–62, 2006.

JONES, B. R. et al. Surrogate matrix and surrogate analyte approaches for definitive quantitation of endogenous biomolecules. **Bioanalysis**, v. 4, n. 19, p. 2343–2356, 2012.

KABUTUTU, Z. et al. Prostaglandin F₂ synthase activities of aldo-keto reductase 1B1, 1B3 and 1B7. **Journal of Biochemistry**, v. 145, n. 2, p. 161–168, 2009.

KACHLICKI, P. et al. Structural characterization of flavonoid glycoconjugates and their derivatives with mass spectrometric techniques. **Molecules**, v. 21, n. 11, 2016.

KAGAN, L. e DeCHERNEY, A. H. “Abnormal menses and dysmenorrhea”. In: *Women's Health: Principles and Clinical Practice*, 74, 786, 2002.

KAMARAJ, S. et al. Modulatory effect of hesperidin on benzo(a)pyrene induced experimental lung carcinogenesis with reference to COX-2, MMP-2 and MMP-9. **European Journal of Pharmacology**, v. 649, n. 1–3, p. 320–327, 2010.

KE, Z. et al. Citrus Flavonoids and Human Cancers. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 3, n. 5, p. 341–351, 2015.

KEBARLE, P.. VERKCERK, U. H. Electrospray: From Ions in solution to Ions in the gas phase, what we know now. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, n. 6, p. 898–917, 2009.

KELEBEK, H.. CANBAS, A.. SELLI, S. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (Citrus sinensis (L.) Osbeck) grown in Turkey. **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1710–1716, 2008.

KHAN, S. A. et al. **Citrus flavonoids: Their biosynthesis, functions and genetic improvement**. [s.l.: s.n.].

KING, A. E.. CRITCHLEY, H. O. D. Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 120, n. 2–3, p. 116–126, 2010.

KOMABA, J. et al. Development and validation of an on-line two-dimensional reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of prostaglandins E(2) and F(2 α) and 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin F(2 α) levels . **Biomedical chromatography : BMC**, v. 23, n. 3, p. 315–23, 2009.

KORECKA, M. et al. Qualification of a Surrogate Matrix-Based Absolute Quantification Method for Amyloid- β 42 in Human Cerebrospinal Fluid Using 2D UPLC-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 41, n. 2, p. 441–451, 2014.

- KORTZ, L.. DOROW, J.. CEGLAREK, U. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of eicosanoids and related lipids in human biological matrices: A review. **Journal of Chromatography B**, v. 964, p. 1–11, 2014.
- KUMAR, S.. PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids. **Hindawi Publishing Corporation The ScientificWorld Journal**, p. 1–16, 2013.
- KUMMER, C. L.. COELHO, T. C. Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid anti-inflammatory drugs: current issues. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 52, n. 4, p. 498–512, 2002.
- LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2009.
- LEDESMA-ESCOBAR, C. A.. PRIEGO-CAPOTE, F.. LUQUE DE CASTRO, M. D. Characterization of lemon (*Citrus limon*) polar extract by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high resolution mode. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 50, n. 11, p. 1196–1205, 2015.
- LI, K. M.. RIVORY, L. P.. CLARKE, S. J. Solid-Phase Extraction (SPE) techniques for sample preparation in clinical and pharmaceutical analysis: A brief overview. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 2, p. 95–102, 2006.
- LIN, L. Z.. HARNLY, J. M. Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 319–326, 2010.
- LIN, Y. et al. Molecular structures of citrus flavonoids determine their effects on lipid metabolism in HepG2 cells by primarily suppressing apoB secretion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4496–4503, 2011.
- LONE, A. M.. TASKÉN, K. Proinflammatory and immunoregulatory roles of eicosanoids in T cells. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. JUN, p. 1–15, 2013.
- LÓPEZ-POSADAS, R. et al. Flavonoids exert distinct modulatory actions on cyclooxygenase 2 and NF- κ B in an intestinal epithelial cell line (IEC18). **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 7, p. 1714–1726, 2010.
- LUBIN, A. et al. Enhanced performance for the analysis of prostaglandins and thromboxanes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a new atmospheric pressure ionization source. **Journal of Chromatography A**, v. 1440, p. 260–265, 2016.
- LV, X. et al. Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. **Chemistry Central Journal**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2015.
- MA, Y. et al. Mass Spectrometric Methods for the Characterisation and Differentiation of Isomeric O -diglycosyl Flavonoids. **Phytochemical Analysis**, v. 165, p. 159–165, 2001.
- MA, Y. L. et al. Internal glucose residue loss in protonated O-diglycosyl flavonoids upon low-energy collision-induced dissociation. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 11, n. 2, p. 136–144, 2000.
- MAJUMDAR, S.. SRIRANGAM, R. Solubility, stability, physicochemical characteristics and in vitro ocular tissue permeability of hesperidin: A natural bioflavonoid. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1217–1225, 2009.

- MALDANER, L.. SALES, C.. JARDIM, F. O ESTADO DA ARTE DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.
- MALEROD, H.. LUNDANES, E.. GREIBROKK, T. Recent advances in on-line multidimensional liquid chromatography. **Anal. Methods**, v. 2, n. 2, p. 110–122, 2010.
- MANTHEY, J. A.. GUTHRIE, N.. GROHMANN, K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 135–153, 2001.
- MAYBIN, J. A.. CRITCHLEY, H. O. D. Menstrual physiology: Implications for endometrial pathology and beyond. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 6, p. 748–761, 2015.
- MEDINA, S. et al. Non-targeted metabolomic approach reveals urinary metabolites linked to steroid biosynthesis pathway after ingestion of citrus juice. **Food Chemistry**, v. 136, n. 2, p. 938–946, 2013.
- MILLER, T. M. et al. A rapid UPLC-MS/MS assay for eicosanoids in human plasma: Application to evaluate niacin responsiveness. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, n. September 2016, p. 1–7, 2017.
- MOGOLLÓN, N. G. S. et al. O ESTADO DA ARTE DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL: CONCEITOS FUNDAMENTAIS, INSTRUMENTAÇÃO E APLICAÇÕES. **Química Nova**, v. 37, n. 10, p. 1680–1691, 2014.
- MORTOLA, J. F. PREMENSTRUAL SYNDROME - PATHOPHYSIOLOGIC CONSIDERATIONS. **The New England Journal of Medicine Editorials**, v. 338, n. 4, p. 256–257, 1998.
- MULLETT, W. M. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 2, p. 263–273, 2007.
- MURIAS, M. et al. Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: Synthesis and structure-activity relationship. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 21, p. 5571–5578, 2004.
- NAFEES, S. et al. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats : Role of NF κ B / MAPK pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v. 231, p. 98–107, 2015.
- NALINI, N.. ARANGANATHAN, S.. KABALIMURTHY, J. Chemopreventive efficacy of hesperetin (citrus flavonone) against 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 22, n. 5, p. 397–408, 2012.
- NOGATA, Y. et al. Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 178–192, 2006.
- NOGATA, Y. et al. Isolation of eriocitrin (eriodictyol 7-O-rutinoside) as an arachidonate lipoxygenase inhibitor from Lumie fruit (*Citrus lumia*) and its distribution in Citrus species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 82–89, 2007.
- NORMAN, R. J.. WU, R. **The potential danger of COX-2 inhibitorsFertility and**

Sterility, 2004.

NOVÁKOVÁ, L.. VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1–2, p. 8–35, 2009.

OSOSKI, A. et al. Ethnobotanical literature survey of medicinal plants in the Dominican Republic used for women ' s health conditions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 285–298, 2002.

PANCHE, A. N.. DIWAN, A. D.. CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. 1–15, 2016.

PANUWET, P. et al. Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 93–105, 2016.

PENG, J. et al. New techniques of on-line biological sample processing and their application in the field of biopharmaceutical analysis. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 6, n. 6, p. 540–551, 2016.

PETERSON, J. J. et al. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. SUPPL., p. 66–73, 2006a.

PETERSON, J. J. et al. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. SUPPL., p. 74–80, 2006b.

PIER, B. et al. Comprehensive profiling of prostaglandins in human ovarian follicular fluid using mass spectrometry. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 134, p. 7–15, 2018.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000.

PITT, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. **The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists**, v. 30, n. 1, p. 19–34, 2009.

PUPPOLO, M.. VARMA, D.. JANSEN, S. A. A review of analytical methods for eicosanoids in brain tissue. **Journal of Chromatography B**, v. 964, p. 50–64, 2014.

RIBEIRO, D. et al. Flavonoids Inhibit COX-1 and COX-2 Enzymes and Cytokine/Chemokine Production in Human Whole Blood. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 858–870, 2015.

ROBELDO, T. A. (2017). Influência da Citroterapia na Produção de Prostaglandinas e Citocinas por Mulheres Durante a Menstruação. São Carlos: UFSCar. 64f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP.

ROUZER, C. A.. MARNETT, L. J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S29–S34, 2009.

RYU, Y.. REID, M. J.. THOMAS, K. V. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry with immunoaffinity clean-up for the determination of the oxidative stress biomarker 8-iso-prostaglandin F2alpha in wastewater. **Journal of Chromatography A**, v. 1409, p. 146–151, 2015.

- SALAMONSEN, L. A.. WOOLLEY, D. E. Menstruation: Induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 44, n. 1–2, p. 1–27, 1999.
- SANDHAR, H. K. et al. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, p. 25–41, 2011.
- SHALINI, V.. JAYALEKSHMI, A.. HELEN, A. Mechanism of anti-inflammatory effect of tricetin, a flavonoid isolated from Njavara rice bran in LPS induced hPBMCs and carrageenan induced rats. **Molecular Immunology**, v. 66, n. 2, p. 229–239, 2015.
- SHEN, S. C. et al. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production. **European Journal of Pharmacology**, v. 446, n. 1–3, p. 187–194, 2002.
- SIMMONS, D. L. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 3, p. 387–437, 2004.
- SIMÕES, B. R. L., 2013. Quantificação de carbamazepina, fluoxetina e seus metabolitos principais em leite materno por injeção direta de amostra utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. São Carlos: UFSCar. 106f. Tese Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP.
- SINREIH, M. et al. Expression of AKR1B1 , AKR1C3 and other genes of prostaglandin F2 a biosynthesis and action in ovarian endometriosis tissue and in model cell lines. **Chemico-Biological Interactions journal**, v. 234, p. 320–331, 2015.
- SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F., & CROUCH, S. R. (2006). Fundamentos de Química Analítica. Tradução da 8ª ed. norte-americana. Editora Pioneira Thomson Learning, São Paulo-SP.
- SMITH, O. P. M.. JABBOUR, H. N.. CRITCHLEY, H. O. D. Cyclooxygenase enzyme expression and E series prostaglandin receptor signalling are enhanced in heavy menstruation. **Human Reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1450–1456, 2007.
- SPRENGER, R. F. & AQUINO, A. J. (2015). Perfil cromatográfico – desreplicando para não reisolar. In: CASS, Q. B & CASSIANO, N. Cromatografia Líquida, novas tendências e aplicações. 1ª ed., Elsevier Editora Ltda. ISBN: 978-85-352-7597-1.
- STOHS, S. J.. PREUSS, H. G.. SHARA, M. A Review of the Human Clinical Studies Involving Citrus aurantium (Bitter Orange) Extract and its Primary Protoalkaloid p-Synephrine. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 7, p. 527–538, 2012.
- SUGINO, N. et al. Withdrawal of Ovarian Steroids Stimulates Prostaglandin F2α Production Through Nuclear Factor-κB Activation via Oxygen Radicals in Human Endometrial Stromal Cells: Potential Relevance to Menstruation. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 2, p. 215–225, 2004.
- SUROWIEC, I. et al. LC-MS/MS profiling for detection of endogenous steroids and prostaglandins in tissue samples. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 19, p. 2650–2658, 2011.
- TANAKA, N. et al. Quantification of intracellular and extracellular eicosapentaenoic acid-derived 3-series prostanoids by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty**

Acids, v. 91, n. 3, p. 61–71, 2014.

TEPPNER, M. et al. Quantitative profiling of prostaglandins as oxidative stress biomarkers in vitro and in vivo by negative ion online solid phase extraction - Liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 498, p. 68–77, 2016.

TRIPOLI, E. et al. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 466–479, 2007.

TRUFELLI, H. et al. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, v. 30, n. 3, p. 491–509, 2010.

TSIKAS, D. Quantitative analysis of eicosanoids in biological samples by LC–MS/MS: Mission accomplished? **Journal of Chromatography B**, v. 1012–1013, p. 211–214, 2016.

TSIKAS, D.. ZOERNER, A. A. Analysis of eicosanoids by LC-MS/MS and GC-MS/MS: A historical retrospect and a discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 964, p. 79–88, 2014.

USDA - United States Department of Agriculture & Foreign Agricultural Service. (2018). Citrus: World Markets and Trade, 13. Retrieved from: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf> (Acesso em 25/março/2018).

UZAN, E. et al. Pycnopus laccase-mediated bioconversion of rutin to oligomers suitable for biotechnology applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 1, p. 97–105, 2011.

VEITCH, N. C. **Flavonoid Chemistry of the Leguminosae**. [s.l: s.n.]. v. 2

VERMA, A. K.. PRATAP, R. **The biological potential of flavones** *Natural Product Reports*, 2010.

WALLACE, S.. KEIGHTLEY, A.. GIE, C. Review Dysmenorrhoea. **The Obstetrician and Gynaecologist**, v. 12, p. 149–154, 2010.

WANG, S. et al. Characterization and Metabolic Diversity of Flavonoids in Citrus Species. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

WHITE, M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, n. 3 SUPPL., 1999.

WILLENBERG, I.. MESCHEDE, A. K.. SCHEBB, N. H. Determining cyclooxygenase-2 activity in three different test systems utilizing online-solid phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry for parallel quantification of prostaglandin E2,D2 and thromboxane B2. **Journal of Chromatography A**, v. 1391, n. 1, p. 40–48, 2015.

WU, W. et al. Studies on the flavones using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, n. 2, p. 213–220, 2004.

XU, R. N. et al. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 2, p. 342–355, 2007.

YANG, H. et al. Proteomic Analysis of Menstrual Blood. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 10, p. 1024–1035, 2012.

YASSIN, S. A. T. Herbal Remedy used by Rural Adolescent girls with Menstrual

Disorders. **Journal of American Science**, v. 8, n. 1, p. 467–474, 2012.

YOSHIDA, H. et al. The citrus flavonoids hesperetin and naringenin block the lipolytic actions of TNF- α in mouse adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, n. 3, p. 728–732, 2010.

YUN, C. et al. Accurate quantification of PGE₂ in the polyposis in rat colon (Pirc) model by surrogate analyte-based UPLC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 148, p. 42–50, 2018.

ZHANG, Y. et al. Determination of Prostaglandin E₁ in dog plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 937, p. 97–102, 2013.

ZIYAN, L. et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. **Planta Medica**, v. 73, n. 3, p. 221–226, 2007.

ANEXOS

CAPITULO I

ANEXO 1. Documentos para coleta de amostra humana: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa e TCLE.



Continuação do Parecer: 2.030.658

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisadores esclarecem aspectos relativos à solicitação de emenda.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados adequadamente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_868661_E1.pdf	08/03/2017 13:30:30		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Anuncio_divulgacao.pdf	22/01/2016 14:28:06	EDIONE FATIMA CANZI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Proteomica.pdf	22/01/2016 14:26:20	EDIONE FATIMA CANZI	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	07/10/2015 14:30:37	EDIONE FATIMA CANZI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Doutorado sanduiche Edione Final para Comite ago2015.pdf	06/08/2015 15:37:39		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO CARLOS, 25 de Abril de 2017

Assinado por:
Priscilla Hortense
(Coordenador)

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
Bairro: JARDIM GUANABARA
UF: SP Município: SAO CARLOS

CEP: 13.565-905

Telefone: (16)3351-9883

E-mail: cephumanos@ufscar.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-Graduação em Medicina
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A senhora está sendo convidada a participar da pesquisa **“Análise proteômica de plasma humano sob suplementação de suco de limão Tahiti (*Citrus latifolia*) no controle do fluxo menstrual”**.

Uma grande parte das mulheres apresenta uma menstruação dolorosa antes ou durante o período menstrual, que pode ser acompanhada por dor de cabeça, náusea, desconforto digestivo, inchaço abdominal, dor mamária ou fluxo anormal. O tratamento comumente usado para diminuir esses sintomas é feito por meio do uso de anti-inflamatórios, entretanto o uso desses remédios por longo tempo pode trazer prejuízos como, por exemplo: lesões nos rins, úlceras estomacais, doenças no fígado entre outras. Desta forma, a busca por outros tipos de medicamentos que permitam controlar a dor e o fluxo menstrual exagerado de forma eficaz e segura tem impulsionado a busca por novos tipos de compostos, particularmente os de origem natural.

A partir de pesquisas realizadas por nosso grupo, nós observamos que o suco do limão Tahiti controla de forma eficaz o fluxo menstrual anormal. No entanto, nós ainda não conseguimos identificar qual o mecanismo de ação do suco de limão responsável por esse efeito. Diante disso, propomos um trabalho que tem como objetivo **identificar marcadores no plasma que possam estar associados com os efeitos na menstruação da suplementação natural com suco de limão**. Essa identificação poderia ser muito útil para descobrir como o limão auxilia no controle da menstruação.

A senhora que não apresenta nenhum problema de origem uterina, e está em boas condições de saúde, poderá se desejar, nos ajudar, como voluntária, nesta pesquisa. A sua contribuição será por meio de informações fornecidas e pela doação de duas amostras de sangue coletadas em um intervalo de 6 horas durante 3 ciclos menstruais consecutivos.

Caso concorde com a pesquisa, a senhora será alocada, por sorteio, em um dos dois grupos de estudo: grupo limão ou grupo controle. A senhora deverá responder a um questionário sobre o padrão do seu ciclo menstrual e sobre os fatores relacionados a ele. As participantes deverão, no 1º dia após o início da menstruação, comparecer ao Laboratório no período da manhã para a coleta da 1ª amostra de sangue e, em seguida, ingerir o suco de um limão Tahiti ou copo de água, no caso do grupo controle. Após 4 horas de intervalo, as voluntárias serão submetidas a uma segunda coleta de sangue. Todo o procedimento será realizado por profissional habilitado usando luvas, máscara, agulha e seringa descartáveis após serem tomados todos os cuidados de antisepsia preconizados para este tipo de procedimento. Esse esquema de coleta será realizado em três ciclos menstruais consecutivos.

Os riscos envolvidos com a sua participação na pesquisa serão mínimos. Algumas pessoas poderão sentir tonteira durante ou após o procedimento de coleta de sangue. Para minimizar esse acontecimento, a senhora será orientada a permanecer sentado durante alguns minutos até que se sinta confortável para levantar. O procedimento de coleta poderá, em alguns casos, causar no local da punção, um hematoma que deverá desaparecer em 3 a 4 dias ou pequeno desconforto nas primeiras horas. Em relação às informações fornecidas, existe, também, a chance de constrangimento, pois algumas perguntas podem remeter a algum desconforto, evocar sentimentos ou lembranças desagradáveis, e perda do anonimato. Para diminuir esse risco, a senhora poderá optar pela suspensão imediata da entrevista. Além disso, na ficha de exame clínico não aparecerá nenhum nome que a identifique, apenas um número que somente o pesquisador principal saberá a quem se refere. Somente as pessoas envolvidas com a pesquisa terão acesso às fichas das voluntárias. Os

dados coletados serão somente divulgados em eventos, revistas e/ou trabalhos científicos, sempre preservando a identidade das participantes.

Como benefícios indiretos da sua participação, os dados obtidos nessa pesquisa poderão servir para ajudar imensamente outras pessoas na medida em que, poderemos identificar os componentes responsáveis pela eficácia do produto natural no controle dos ciclos menstruais anormais.

A participação na pesquisa não é obrigatória, e a sua recusa não implicará em nenhum prejuízo no seu relacionamento com o pesquisador ou com a instituição. A senhora poderá, se desejar, retirar-se do estudo a qualquer momento sem que isto lhe traga qualquer tipo de prejuízo no presente ou no futuro.

A sua participação na pesquisa será gratuita e não haverá compensação em dinheiro pela sua participação. Todas as despesas tais como transporte e alimentação decorrente desta pesquisa serão ressarcidos nos dias das consultas. Todas as informações a seu respeito serão mantidas em segredo.

Se a senhora tiver qualquer problema ou dúvida durante a sua participação na pesquisa poderá comunicar-se pelo telefone (16) 997079197 ou vir neste ambulatório de 2ª. ou 6ª. das 8:00 às 12:00 h e procurar o(a) Dr(a). Priscila de Andrade Bora. A senhora receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do(a) pesquisador(a) responsável, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Após ter recebido todas as informações relacionadas ao estudo, eu _____, certifico que o(a) _____, respondeu a todas as minhas perguntas sobre o estudo, e eu, voluntariamente, aceito participar dele.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa. O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar que funciona na Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, localizada na Rodovia Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676 - CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil.

Nome do voluntário _____

Assinatura do voluntário: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Data _____

Local _____

 Profa Beatriz Helena L N Sales Maia (pesquisadora principal)
 Fone: (41) 33613472
 e-mail: noronha@ufpr.br. bhsalesmaia@gmail.com

Dra. Priscila Maria de Andrade Borra (Médica Responsável)
 Fone: (16) 997079197
 e-mail: pmborra@gmail.com

ANEXO 2. Avaliação de fosfolipídeos coelundo na região das PGs.

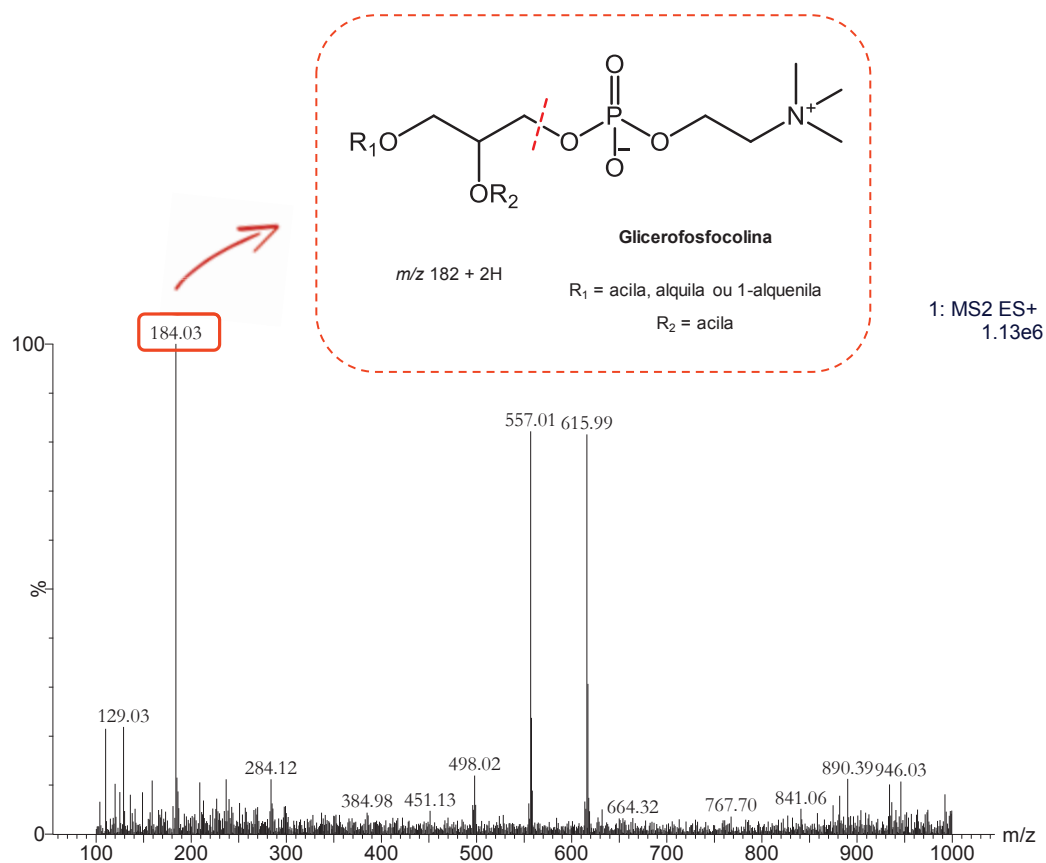


Figura 53. Espectro de massas (90 eV) (ESI⁺) extraído entre 6 e 7 minutos, região de eluição das PGs e fragmento característico m/z 184 monitorado para fosfolipídeos.

ANEXO 3. Avaliação da seletividade do método de SPE-LC-MS/MS para prostaglandinas.

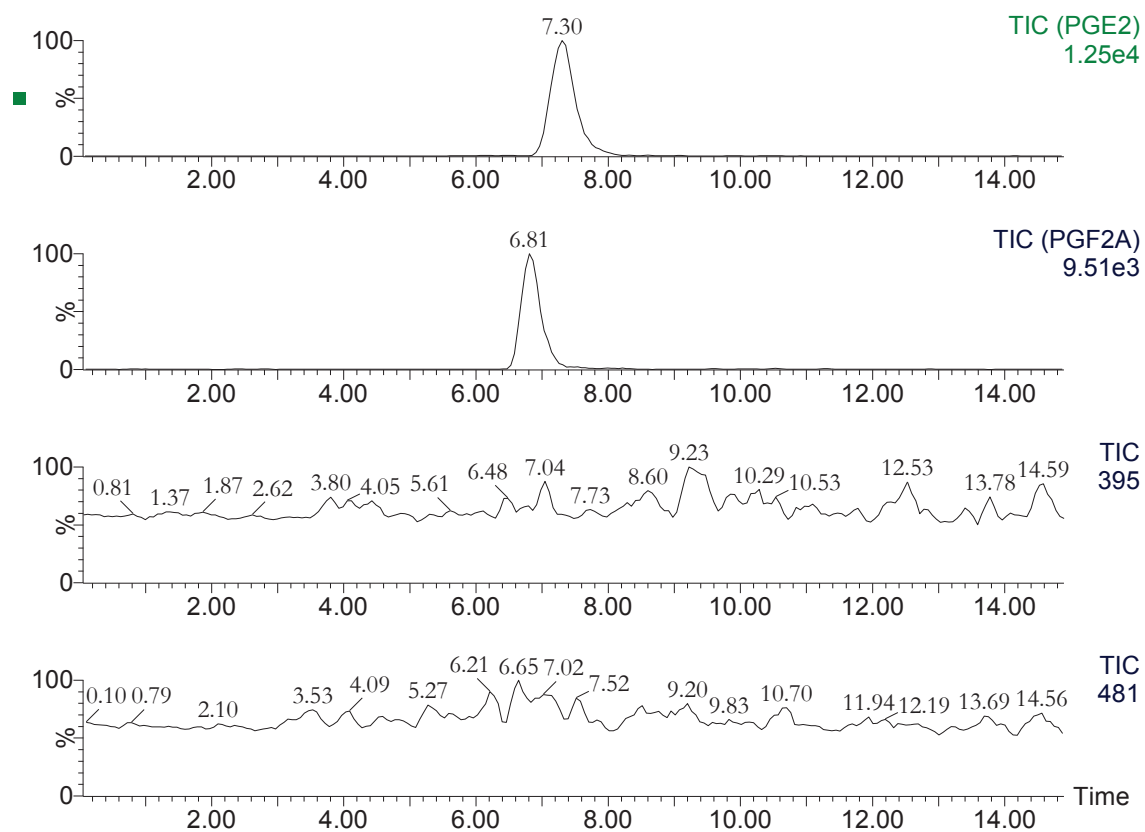
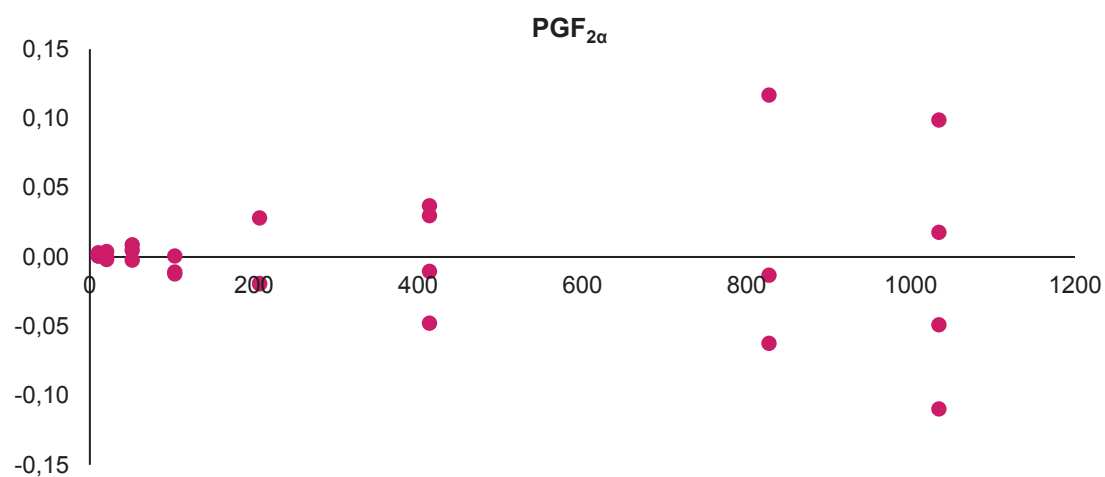
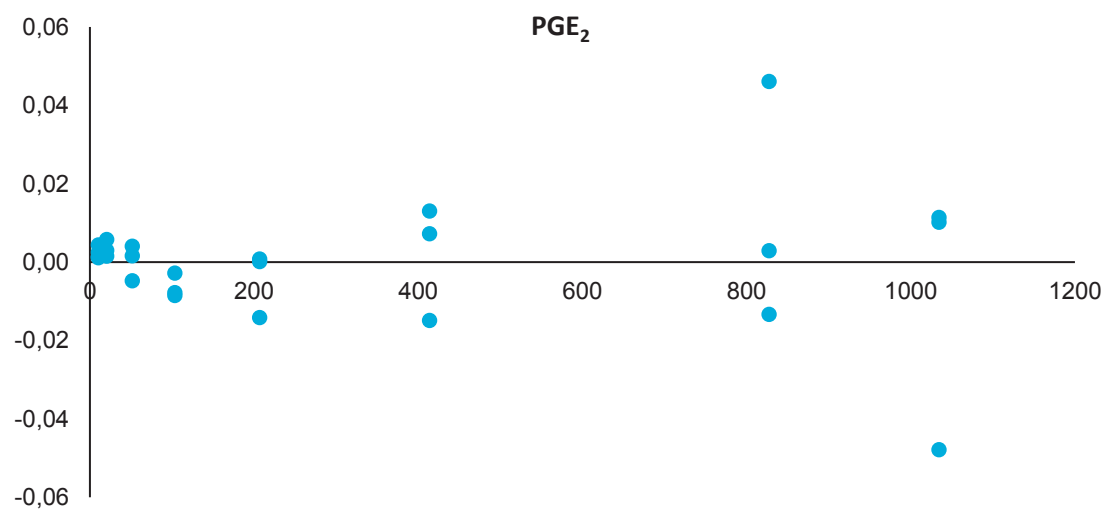


Figura 54. Cromatogramas de íons totais obtidos para o soro branco (abaixo) e soro fortificado as prostaglandinas (acima).

ANEXO 4. Gráficos de resíduos construídos para regressão linear para cada PG.**Figura 55.** Gráfico de dispersão dos resíduos em função de X para PGF_{2α}.**Figura 56.** Gráfico de dispersão dos resíduos em função de X para PGE₂.

CAPITULO II

Dados referentes aos compostos identificados por análise de padrão.

ANEXO 5. Cromatograma de íons totais (LC-MS/MS) da fração orgânica do suco de limão Tahiti.

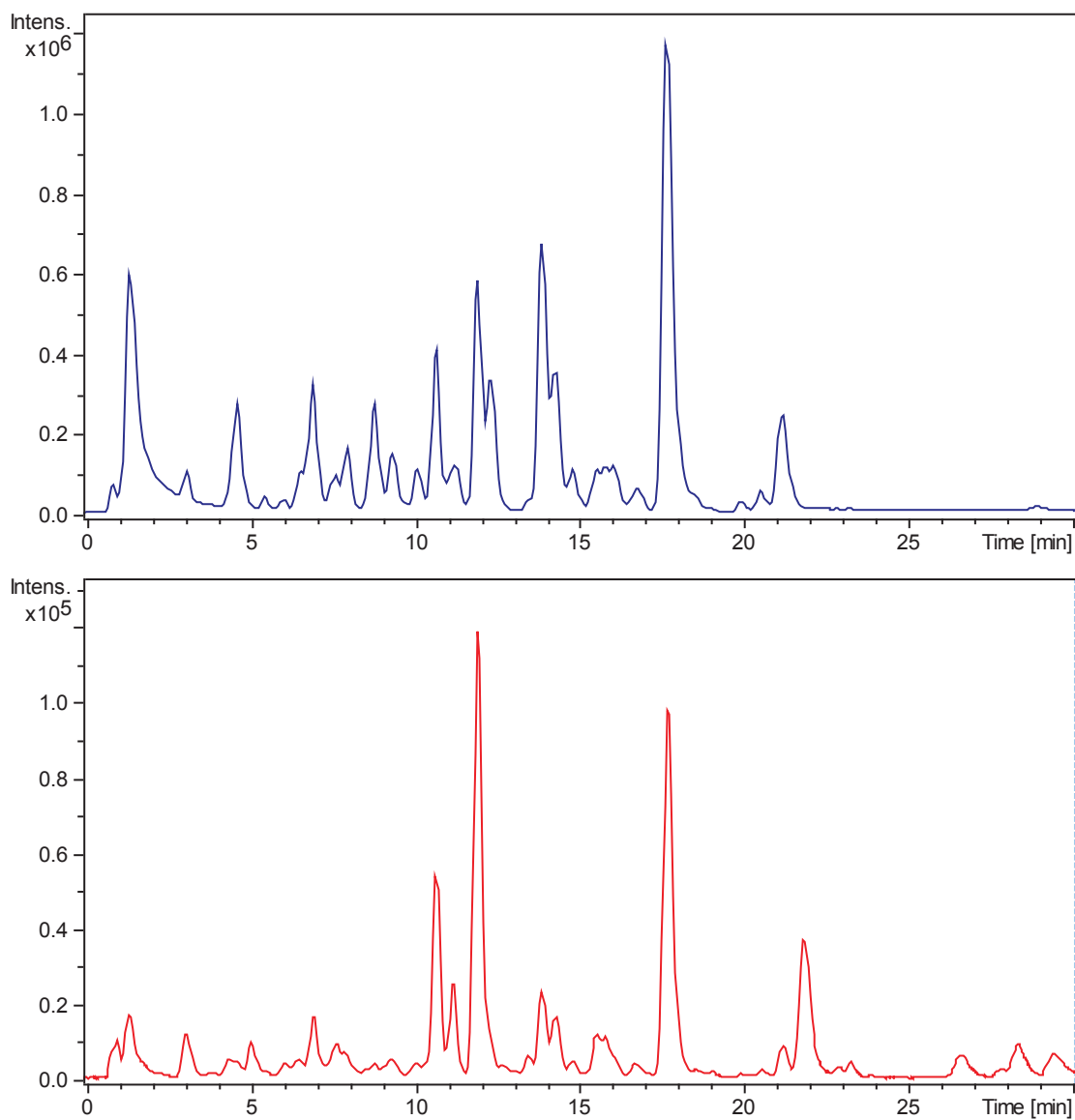


Figura 57. Espectros de massas (LC-QqToF) do suco de limão Tahiti. Acima: modo negativo (ESI⁻), abaixo: modo positivo (ESI⁺).

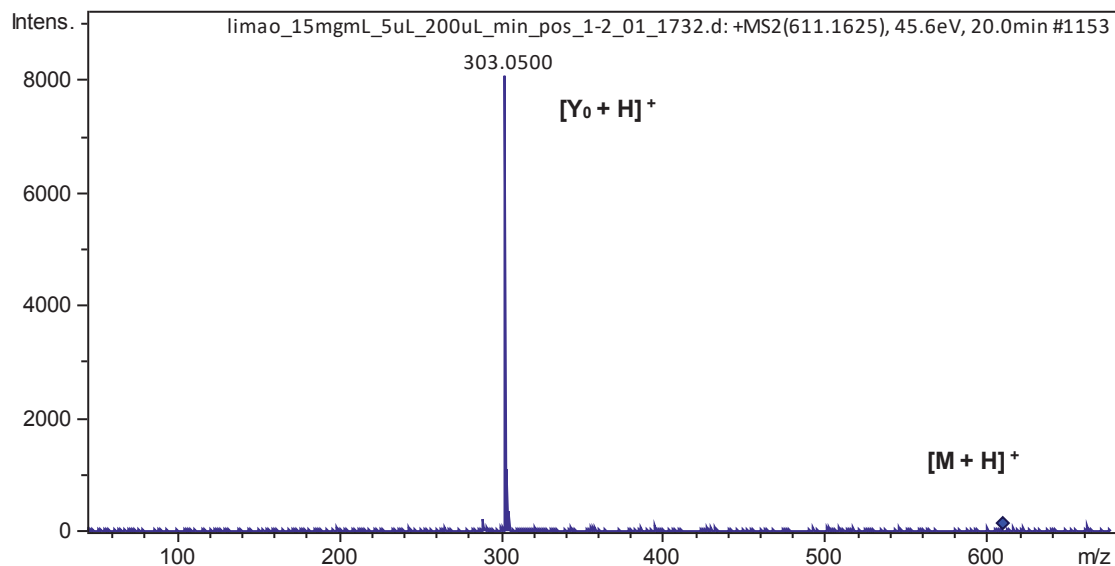
ANEXO 6. Espectros de massas para Rutina.

Figura 58. Espectro de ESI⁺ (45 eV) para rutina (tr = 20 min) m/z 611,1625.
Espectro de ESI⁺ (38 eV) de rutina m/z 611,1623.

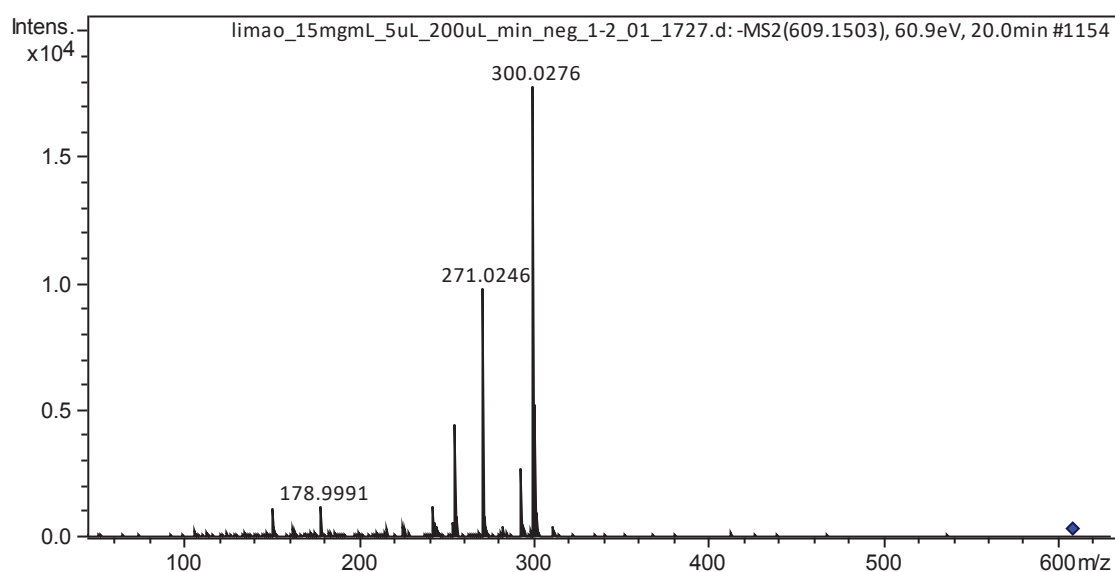


Figura 59. Espectro de ESI⁻ (60 eV) para rutina (tr = 20 min) m/z 609,1503.

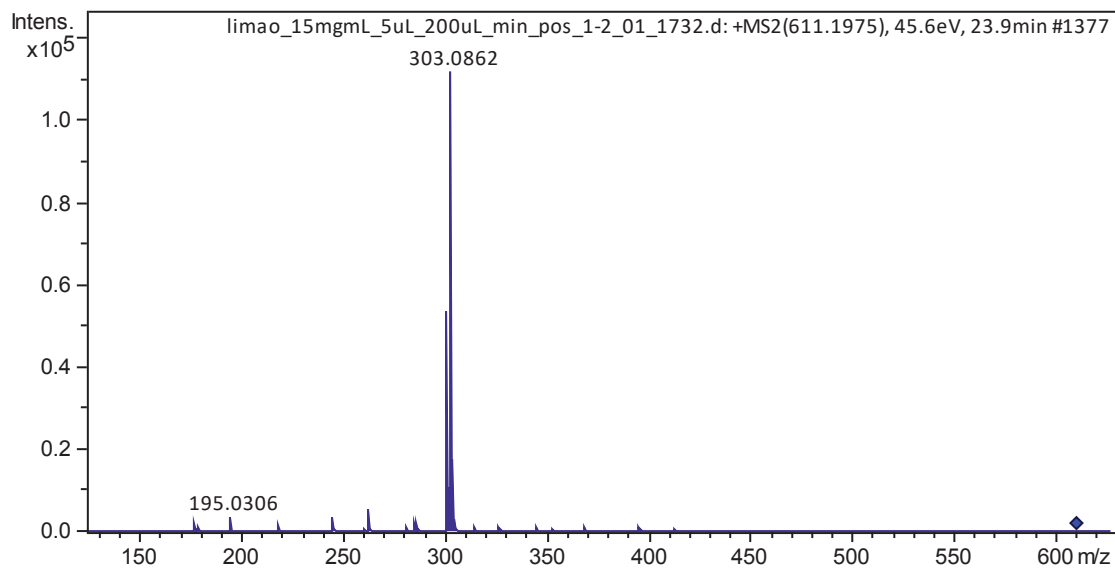
ANEXO 7. Espectros de massas para Hesperidina.

Figura 60. Espectro de ESI⁺ (45 eV) para hesperidina (tr = 24 min) m/z 611,1975.

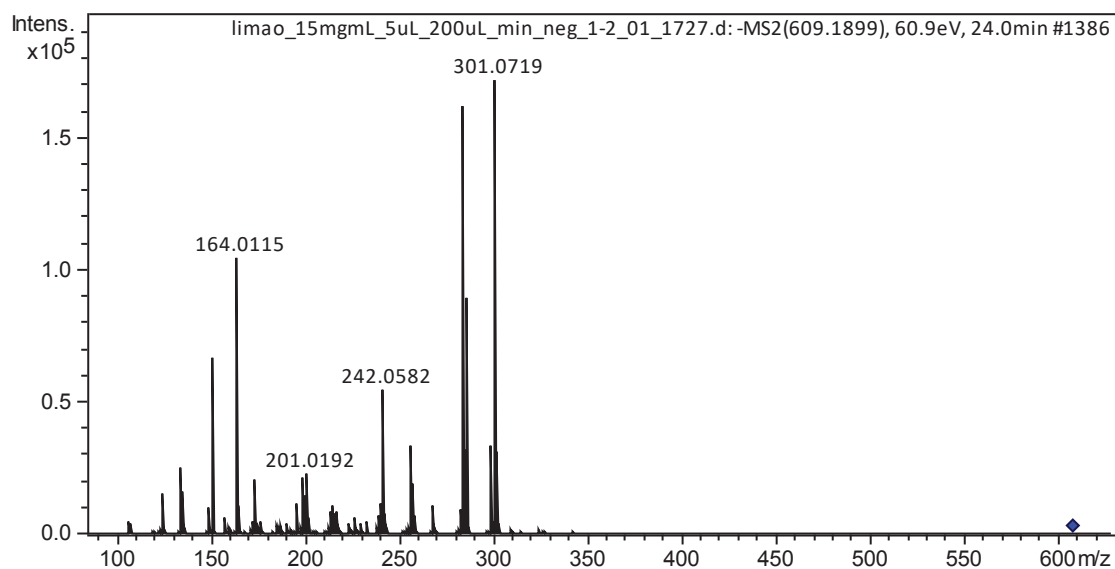
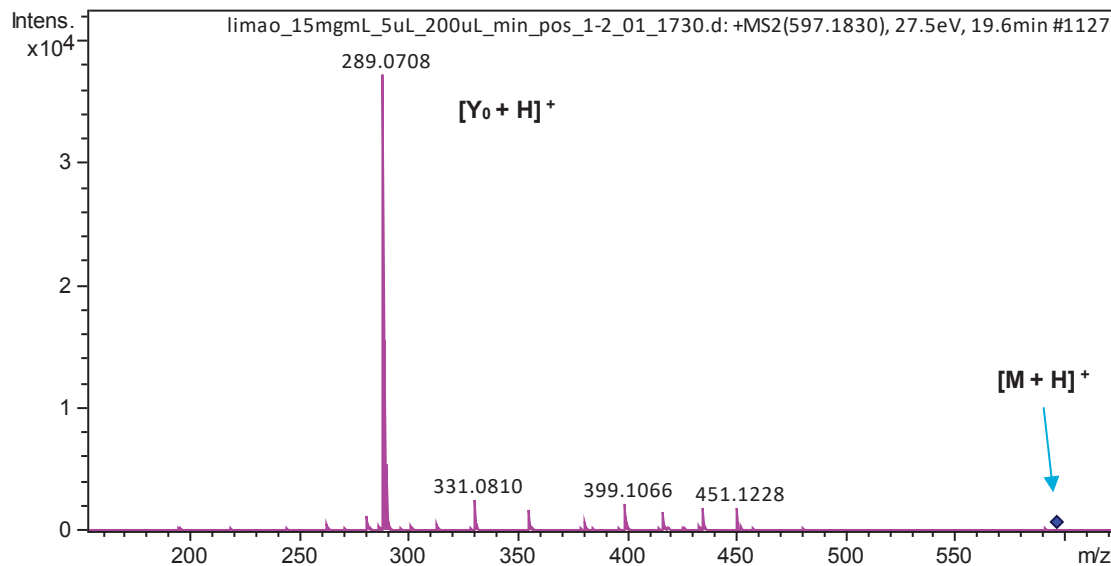
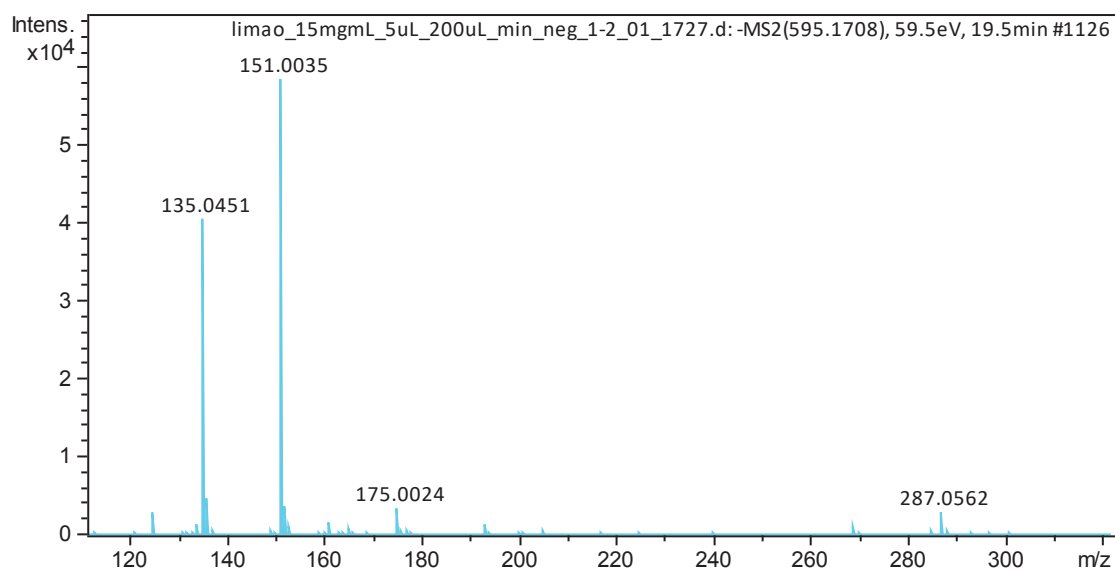
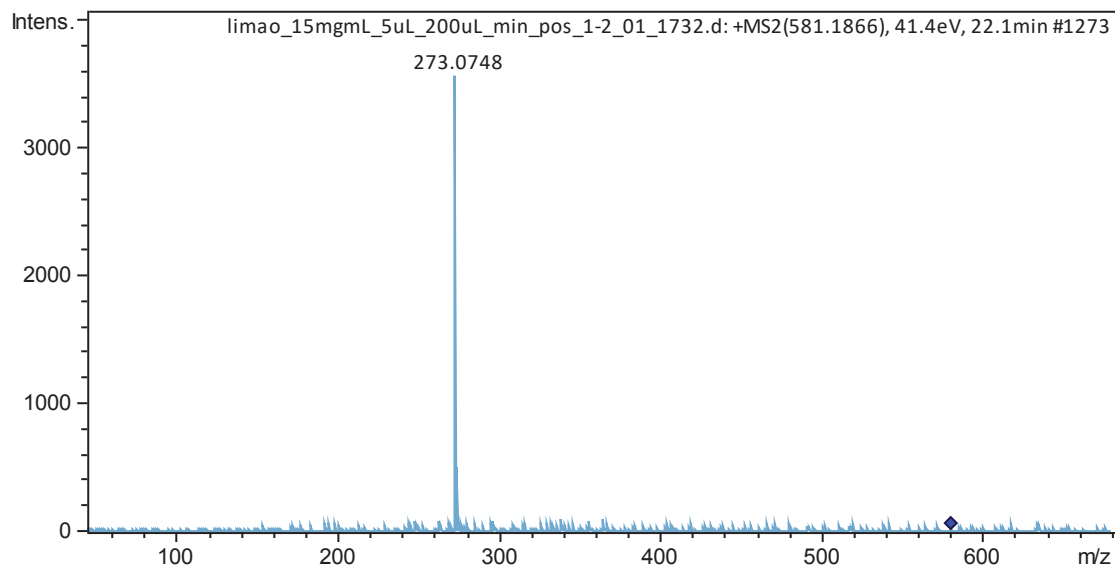
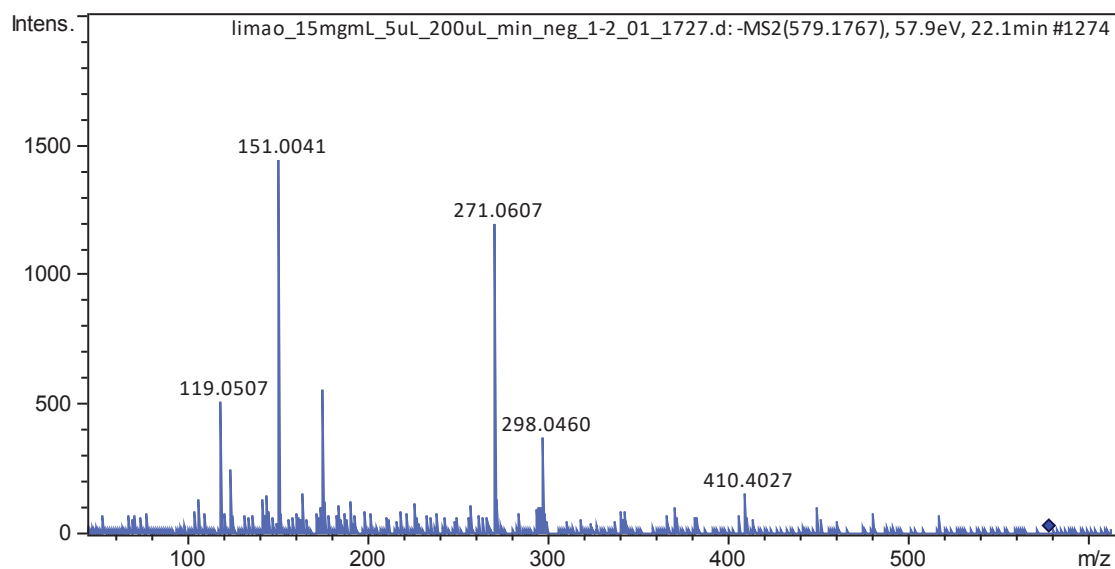


Figura 61. Espectro de ESI⁻ (60 eV) para hesperidina (tr = 24 min) m/z 609,1899.

ANEXO 8. Espectros de massas para Eriocitrina.**Figura 62.** Espectro de ESI⁺ (27 eV) para eriocitrina (tr = 19,6 min) m/z 597,1830.**Figura 63.** Espectro de ESI⁻ (60 eV) para eriocitrina (tr = 19,5 min) m/z 595,1708.

ANEXO 9. Espectros de massas para Naringina.**Figura 64.** Espectro de ESI+ (41 eV) para naringina (tr = 22,1 min) m/z 581,1866.**Figura 65.** Espectro de ESI- (58 eV) para naringina (tr = 19,5 min) m/z 579,1767.

Dados referentes aos compostos inferidos por desreplicação.

ANEXO 10. Espectros de massas para Diosmina ou neodiosmina.

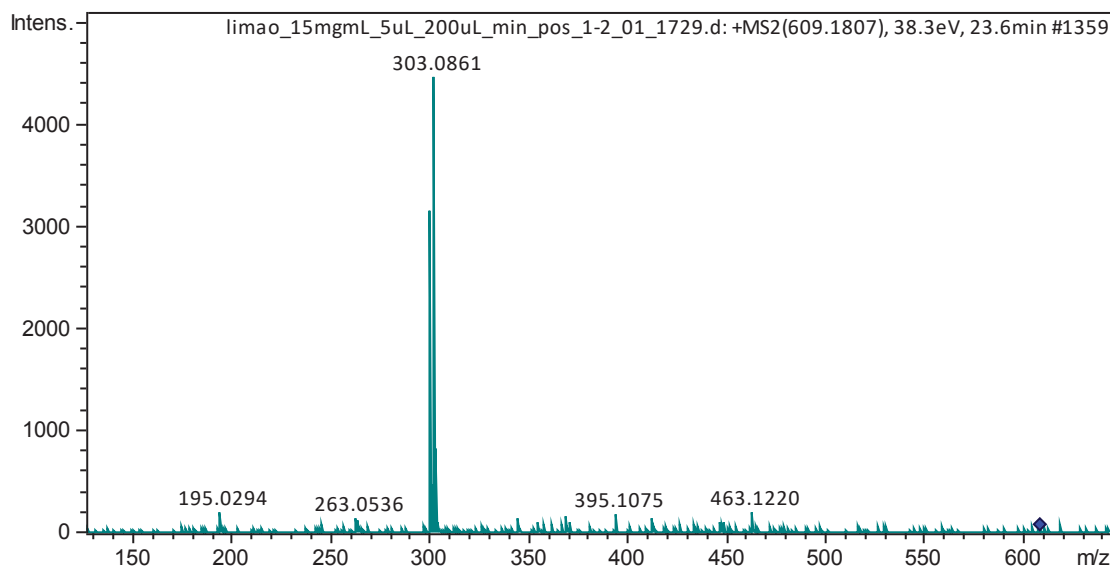


Figura 66. Espectro de ESI⁺ (45 eV) para diosmina/neodiosmina (tr = 23,4 min) m/z 609,1846.

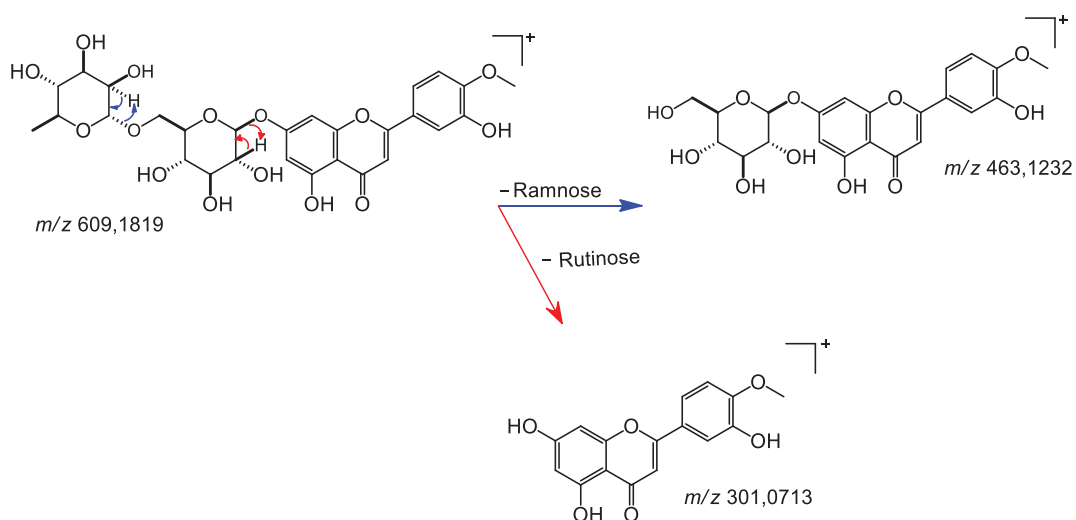


Figura 67. Proposta de fragmentação para m/z 609,1819, modo ESI⁺

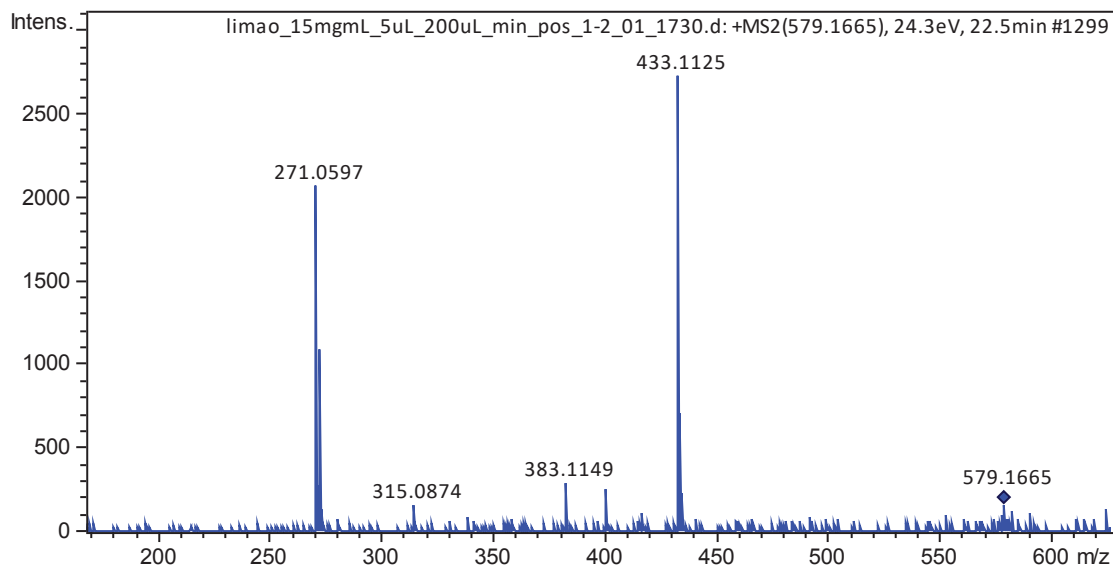
ANEXO 11. Espectros de massas para Apigenin-7-O-rutinoside ou neohesperidose.

Figura 68. Espectro de ESI⁺ (24 eV) para apigenin-7-O-rutinoside ou neohesperidose (tr = 24,3 min) m/z 579,1760.

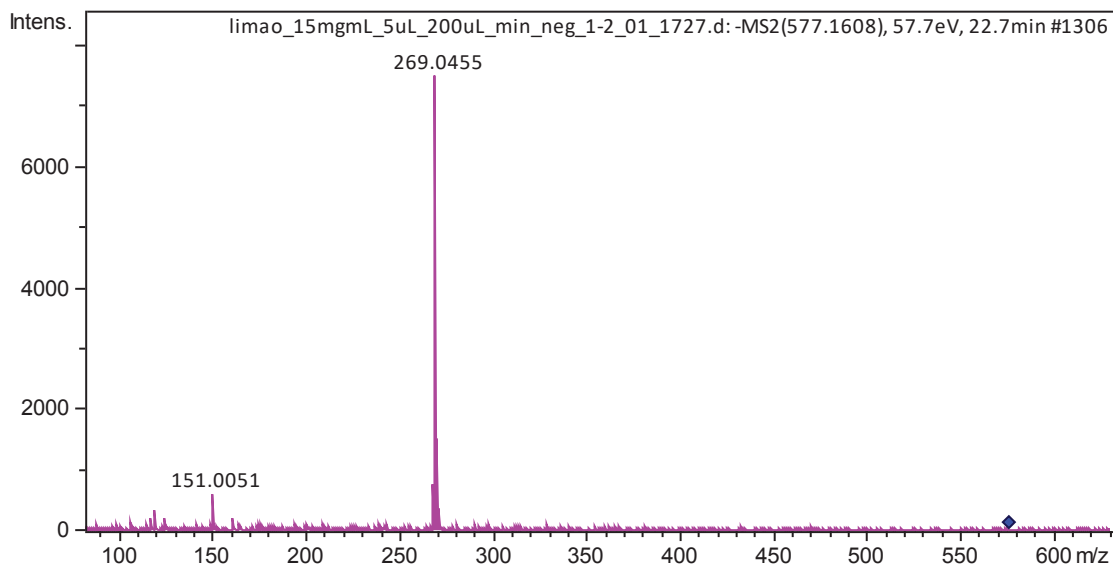
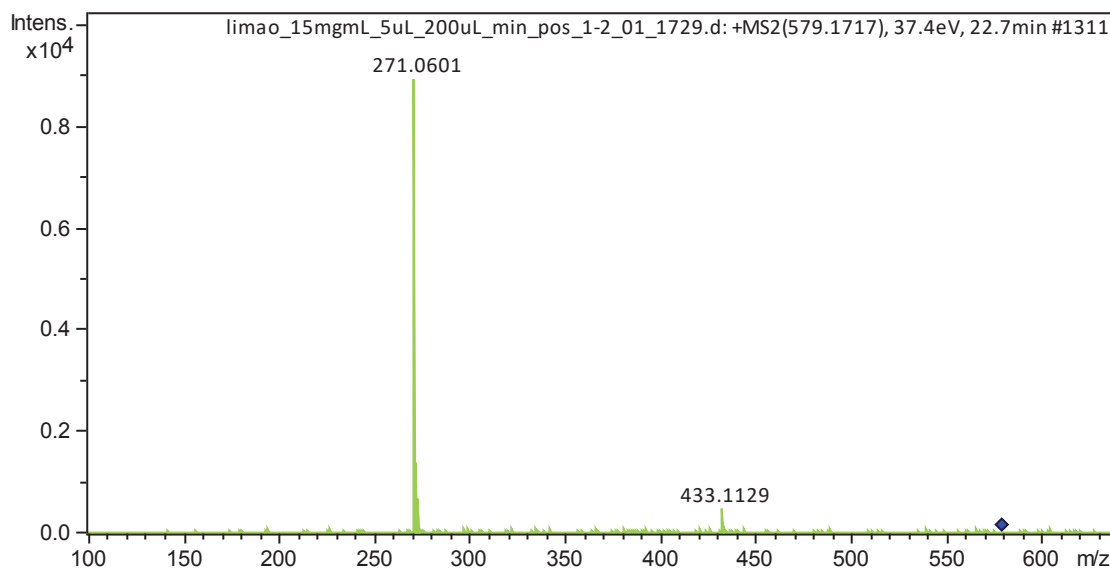
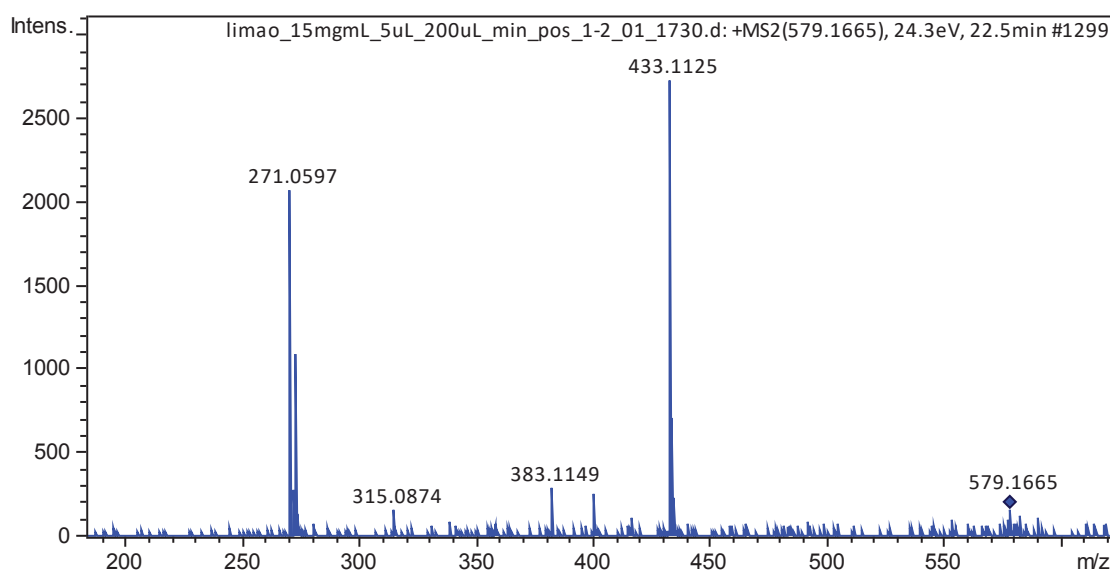
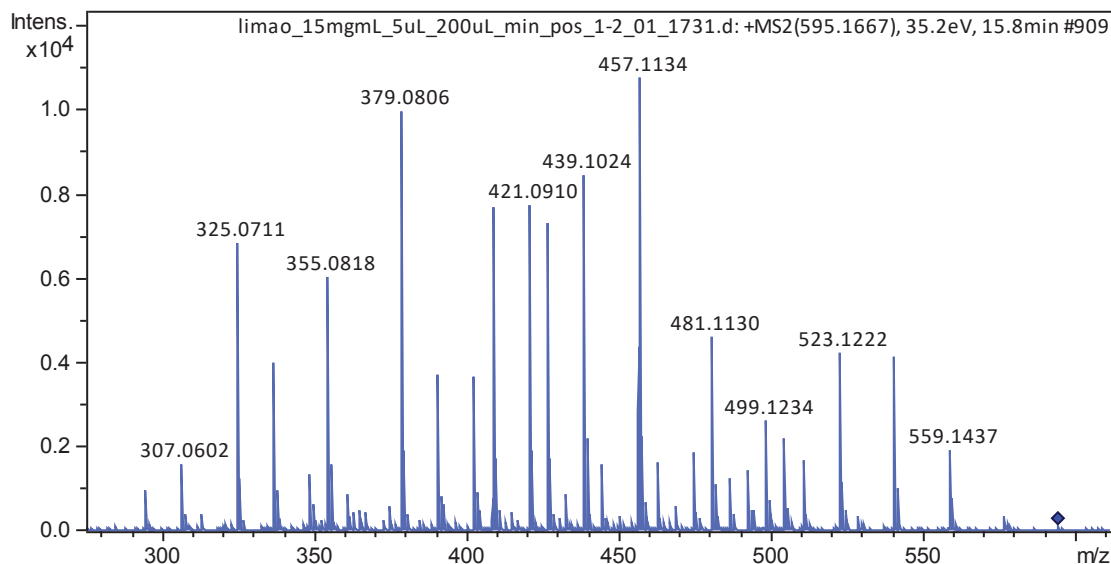
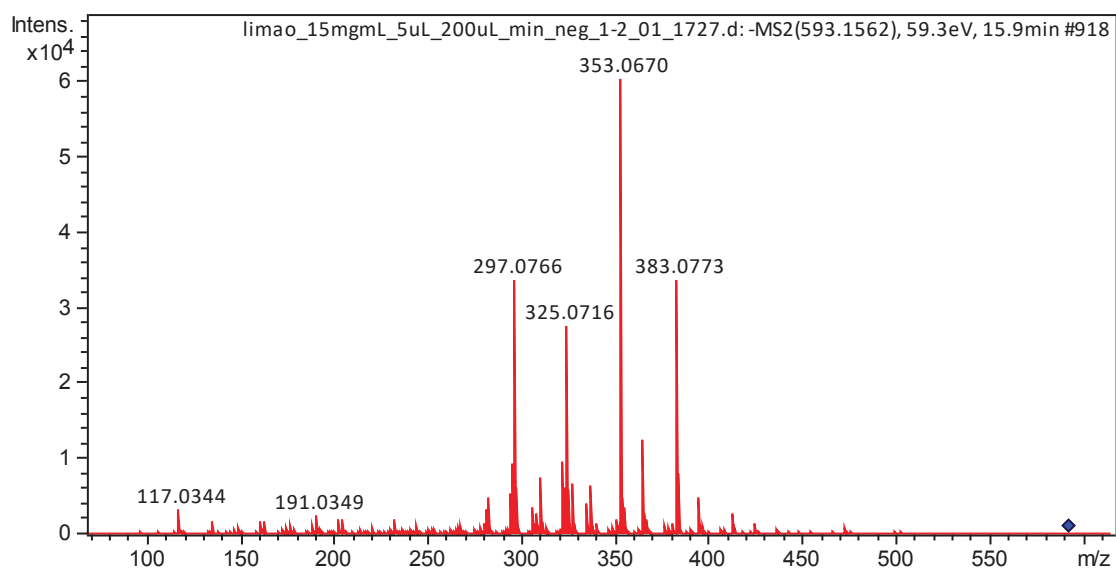


Figura 69. Espectro de ESI⁻ (58 eV) para apigenin-7-O-rutinoside ou neohesperidose (tr = 24,3 min) m/z 577,1608.

ANEXO 12. Espectros de massas para Vitexin 2"-O-rhamnoside.**Figura 70.** Espectro de ESI⁺ (37 eV) para vitexin 2''-O-rhamnoside (tr = 22,7 min) m/z 579,1717.**Figura 71.** Espectro de ESI⁻ (24 eV) para vitexin 2''-O-rhamnoside (tr = 22,5 min) m/z 579,1665.

ANEXO 13. Espectros de massas para Vicenina-2.**Figura 72.** Espectro de ESI⁺ (35 eV) para vitexin 2''-O-rhamnoside (tr = 15,8 min) m/z 595,1667.**Figura 73.** Espectro de ESI⁻ (59 eV) para vitexin 2''-O-rhamnoside (tr = 15,9 min) m/z 593,1562.

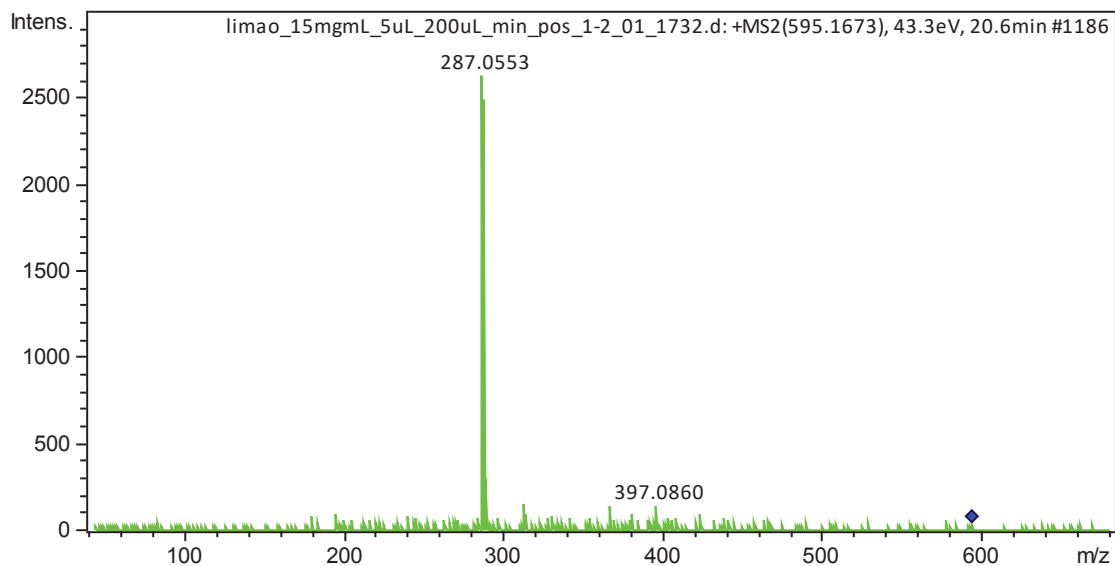
ANEXO 14. Espectros de massas para Luteolina 7-O-rutnose ou neohesperidose.

Figura 74. Espectro de ESI⁺ (43 eV) para luteolina 7-O-rutnose ou neohesperidose (tr = 20,6 min) m/z 595,1673.

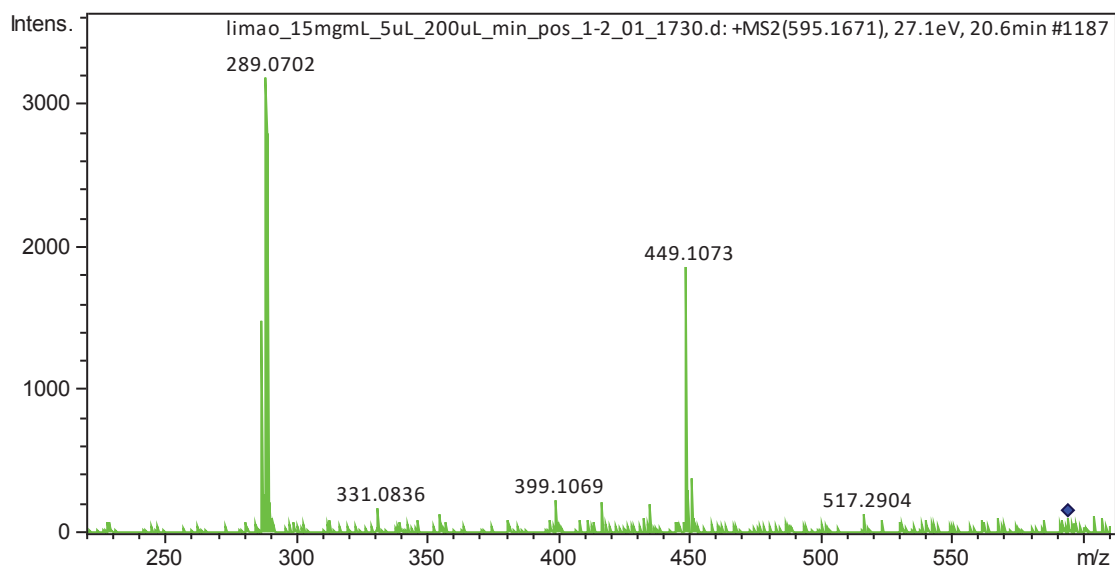


Figura 75. Espectro de ESI⁺ (27 eV) para luteolina 7-O-rutnose ou neohesperidose (tr = 20,6 min) m/z 595,1671.

ANEXO 15. Dados dos padrões de agliconas analisados, mas não encontrados no suco de limão Tahiti.

Quercetina

Os espectros do padrão de quercetina ($t_r = 22,5$ min) mostraram como íons moleculares m/z 301,0273 (ESI^-) e m/z 303,0508 (ESI^+) (35eV). Os principais fragmentos encontrados no modo de ionização negativo são $^{1,2}\text{A}^-$ (m/z 178,9980) e $^{1,3}\text{A}^-$ (m/z 151,0033), ambos os fragmentos típicos de mecanismo RDA para flavonol. Outras perdas são observadas, como duas perdas neutras de CO, referentes aos fragmentos m/z 273,0390 e 245,0450 (Figura 75).

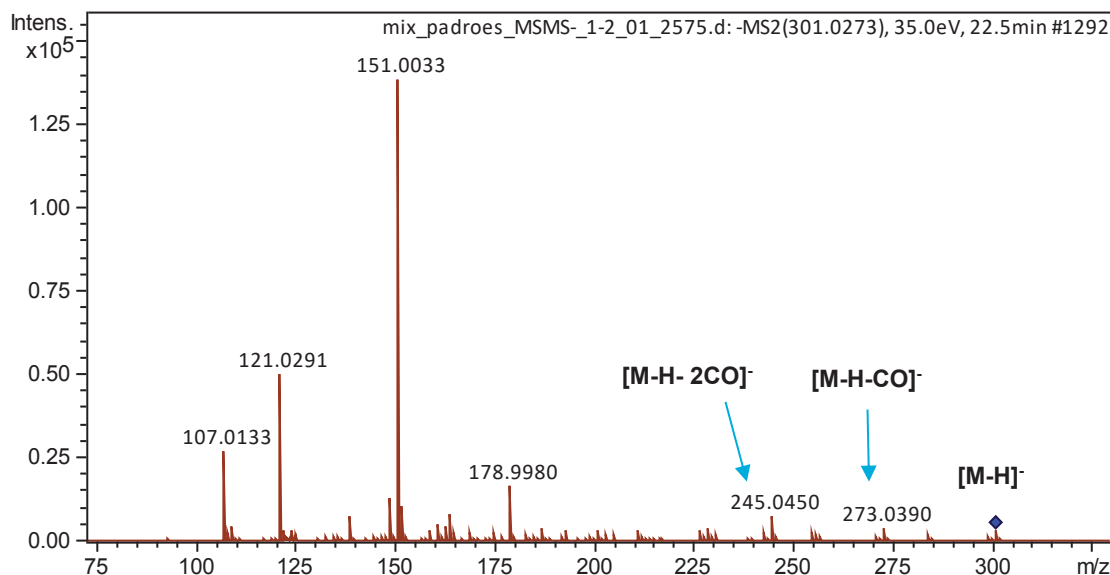


Figura 76. Espectro de ESI^- (35eV) do padrão quercetina ($t_r = 22,5$ min) m/z 301,0273.

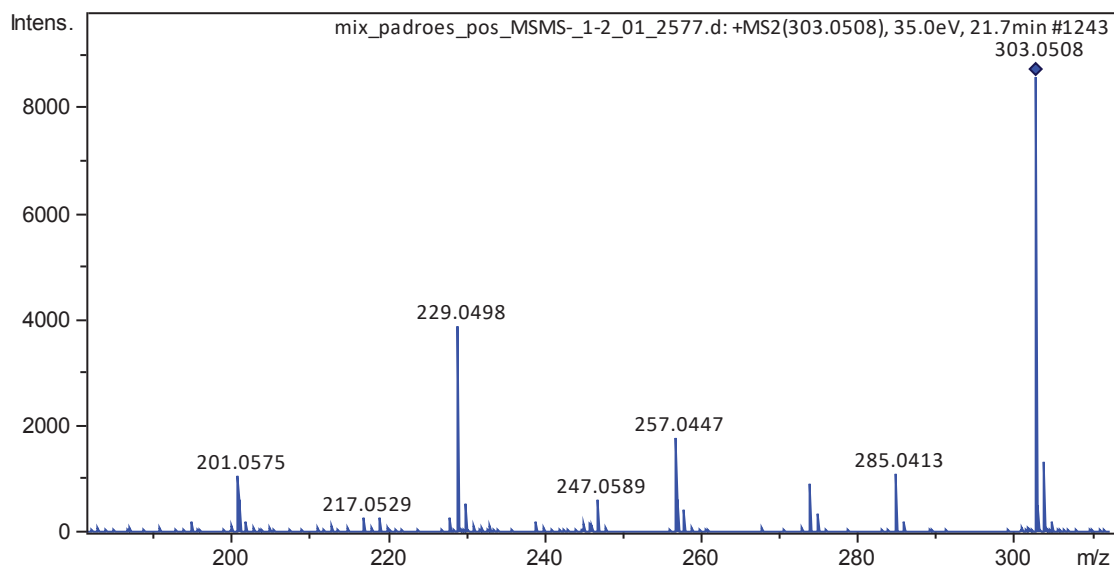


Figura 77. Espectro de ESI⁺ (35eV) do padrão quercetina m/z 303,0508.

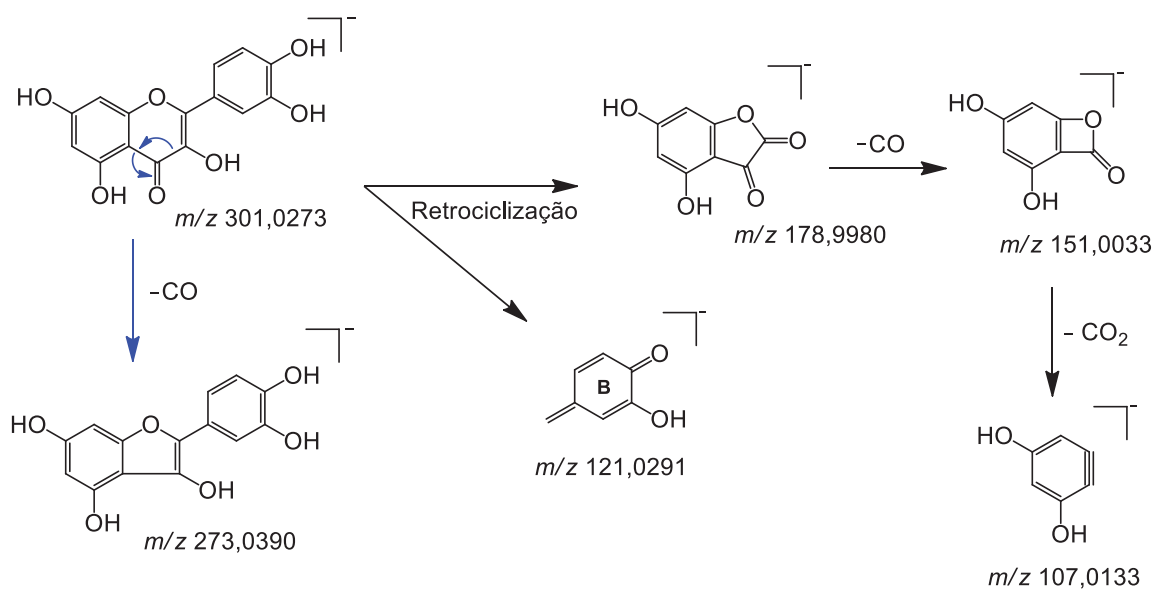


Figura 78. Proposta de fragmentação para quercetina, modo ESI⁻.

O espectro no UV de quercetina mostrou duas bandas principais em 370 e 255 nm, o que é característico de flavonol.

Naringenina

A flavanona naringenina ($t_r = 25,3$ min) (m/z 271,0691, modo ESI^-) é a aglicona dos glicosídeos naringina e narirutina. O espectro de ESI^- (35eV) mostrou como pico base o íon fragmento m/z 119,0499, referente ao fragmento $^{1,3}B_0^-$, bem como outros fragmentos derivados da clivagem RDA: $^{1,3}A_0^-$ (m/z 151,0030) e $(^{1,3}A_0 - CO_2)$ (m/z 107,0132). Para o espectro de ESI^+ (20eV) é possível observar o fragmento m/z 153,0253, referente à clivagem RDA (Figura 79).

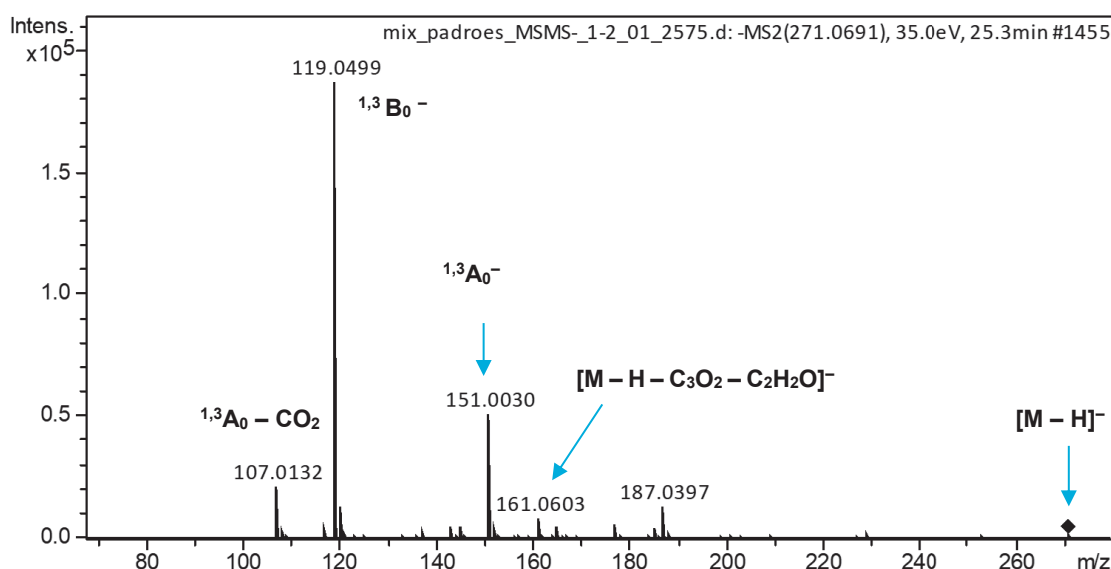


Figura 79. Espectro de ESI^- (acima) (35eV) do padrão naringenina m/z 271,0691.

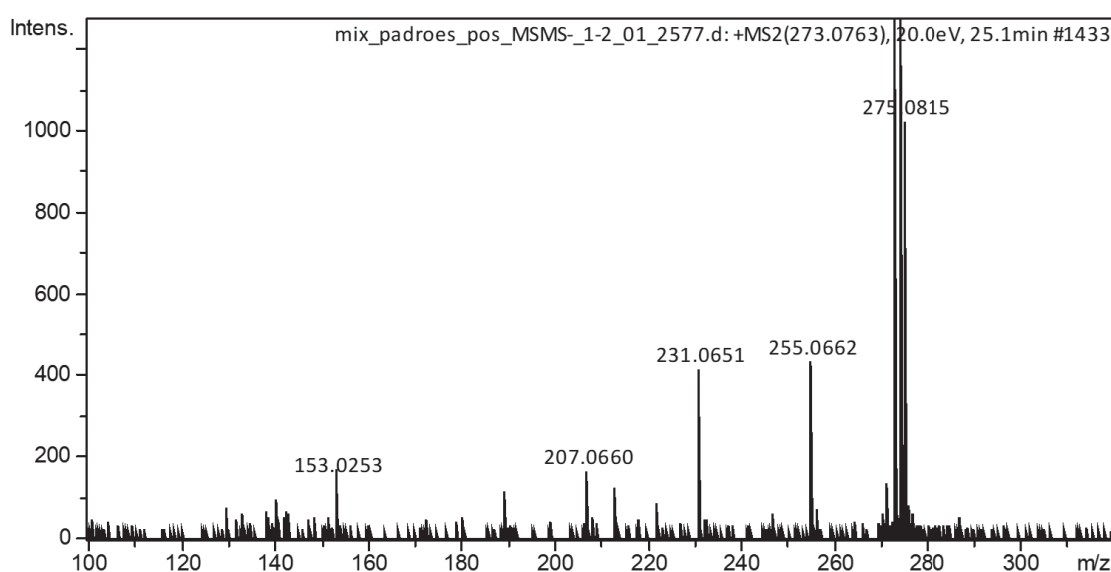


Figura 80. Espectro de ESI^+ do padrão naringenina 273,0763.

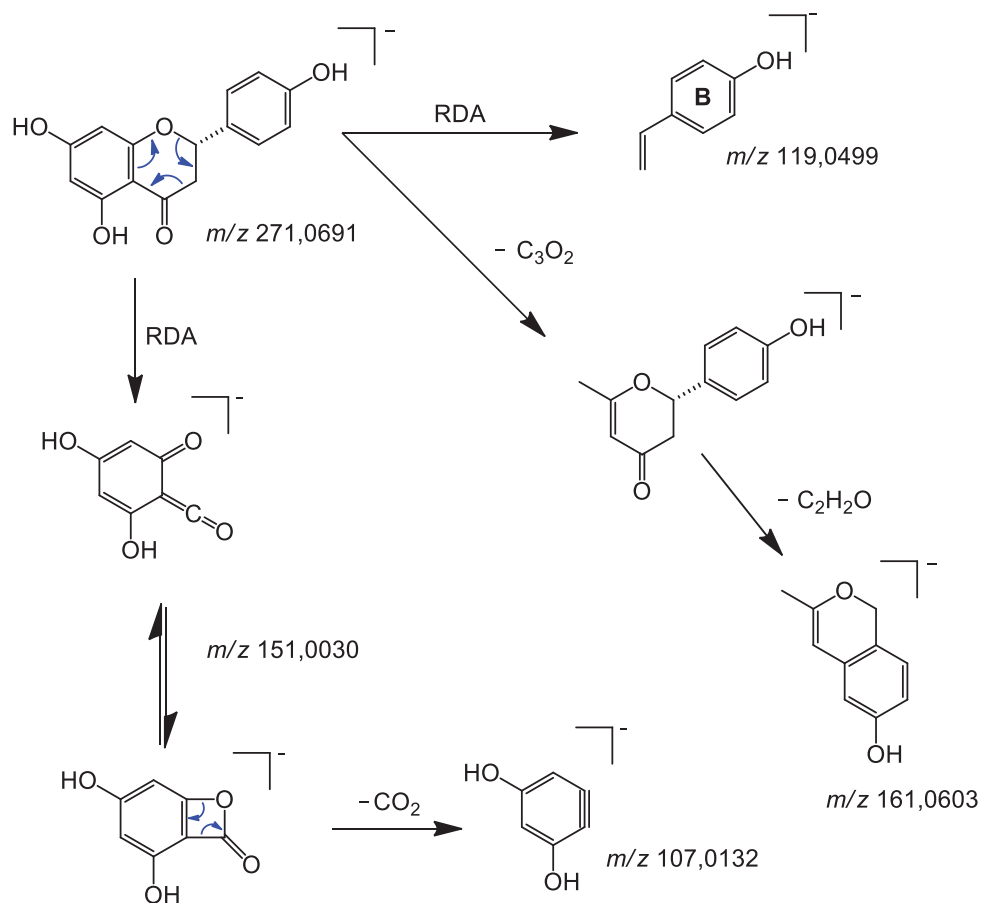


Figura 81. Proposta de fragmentação para naringenina, modo ESI⁻.

O espectro adquirido no modo positivo apresentou fragmentos pouco intensos. E o espectro no UV mostrou a principal banda em 289 nm, um pequeno “ombro” em 330 nm e, ainda, outra banda intensa 212 nm. As duas primeiras bandas são características de flavanona, enquanto que a terceira pode ser decorrente de impurezas ou degradação do padrão.

ANEXO 16. Dados dos padrões dos Ácidos fenólicos analisados, mas não encontrados no suco de limão Tahiti.

Ácido Cafeico

O espectro de massas ESI⁻ para o padrão de ácido cafeico (m/z 179,0276) (t_r = 8,5 min) apresentou três fragmentos principais, sendo o pico base (m/z 135,0447), referente a perda de CO₂. O segundo fragmento (m/z 117,0341) com perda neutra de 18u, é indicativo de uma molécula de H₂O. E o último fragmento (m/z 107,0498), referente a perda neutra de 28u, sugere clivagem de CO. A proposta para o mecanismo de fragmentação de perda de CO₂ está na Figura 82.

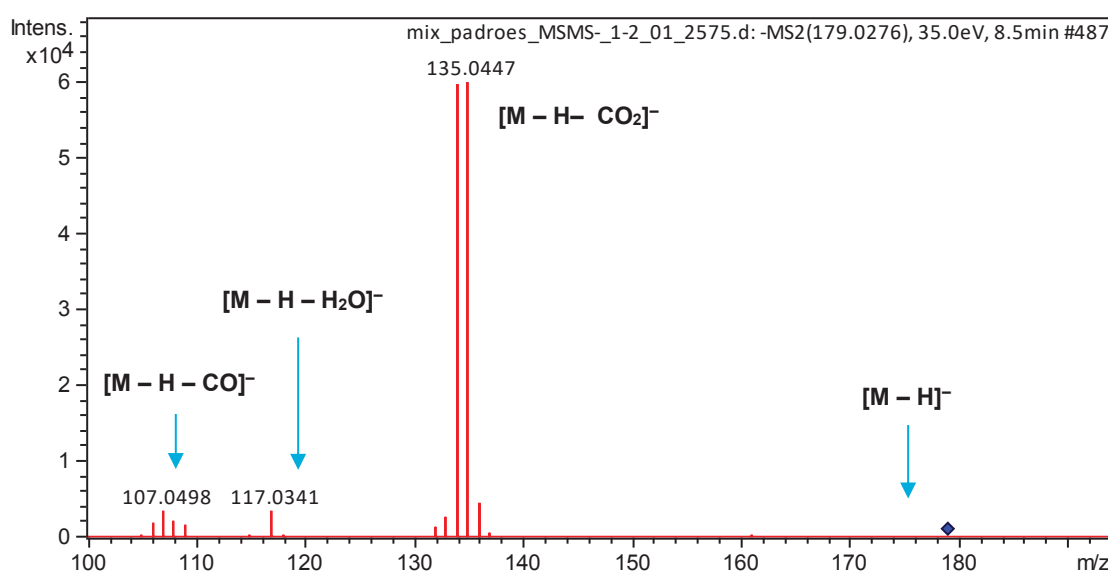


Figura 82. Espectro de ESI⁻ (35 eV) do padrão de ácido cafeico m/z 179,0276.

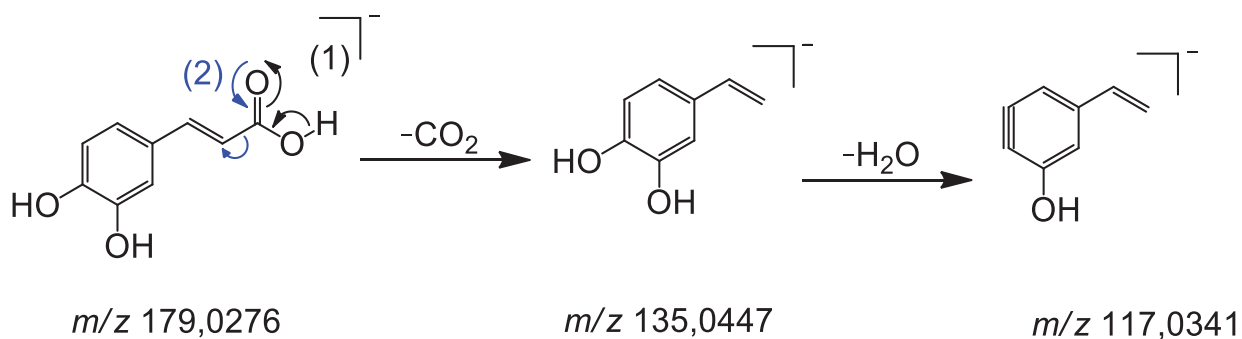


Figura 83. Proposta de fragmentação para o ácido cafeico, modo ESI⁻.

O espectro no UV mostrou duas bandas típicas de ácido cafeico em 323 nm e em de 210 nm.

Ácido Gálico

O espectro de ESI⁻ para o ácido gálico (m/z 169,0071) (tr = 2,5 min) apresentou um único fragmento produto (m/z 125,0240), íon referente a perda de CO₂, conforme explicado na proposta para o mecanismo de fragmentação (Figura 84).

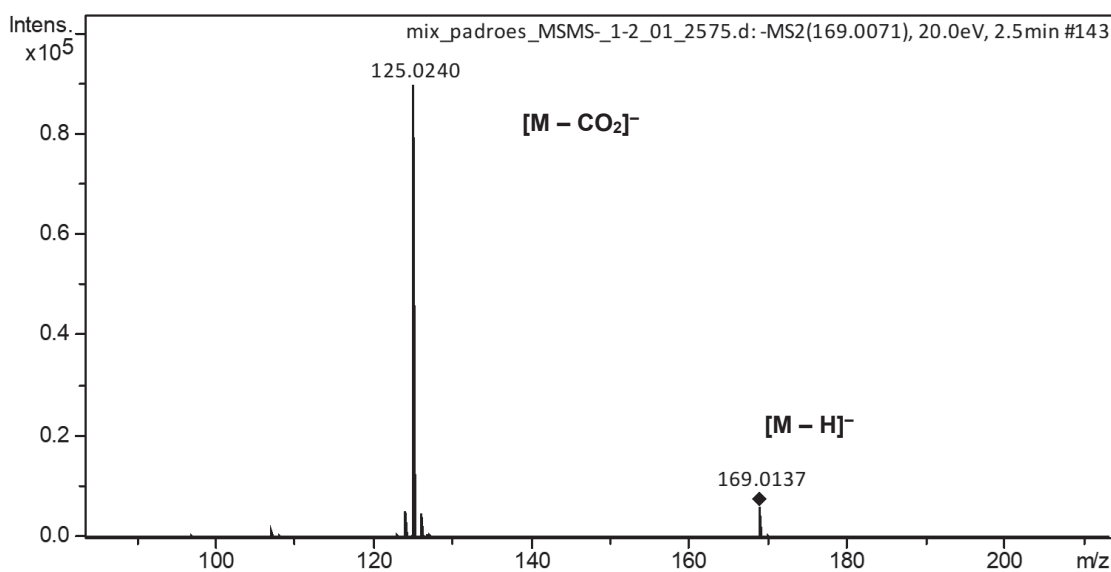


Figura 84. Espectro de ESI⁻ (20eV) do padrão de ácido gálico m/z 169,0071.

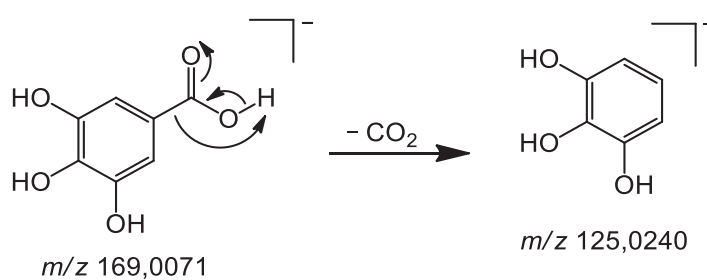


Figura 85. Proposta de fragmentação para o ácido gálico, modo ESI⁻.

Duas bandas foram observadas no espectro no UV para o ácido gálico, a mais intensa em 215 nm e outra, de menor intensidade, em 271 nm.